

MANOEL FRANCISCO GUIMARÃES

PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DA L-FUCOSE
DESIDROGENASE DE **PULLULARIA PULLULANS**

TESE DE MESTRADO APRESENTADA
AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ

CURITIBA

1973

Tese orientada pelo

Prof. Dr. Luis Alberto da Silva Veiga

I N D I C E

p.

INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	5
Reagentes	5
Condições de Cultura	6
Métodos Analíticos	8
Purificação da L-fucose Desidrogenase	10
RESULTADOS	14
Purificação da Enzima	14
Proporcionalidade da enzima	15
Efeito da Temperatura	15
Efeito do pH e Composição do Tampão	20
Estabilidade da Enzima	20
Especificidade da L-fucose Desidrogenase	24
Efeito de Reagentes Orgânicos e Inorgânicos	25
Propriedades Cinéticas	30
Identificação do Produto	38
Estequiometria e Reversibilidade	39
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Fig. 1 - Filtração em Gel Sephadex G-100	16
Fig. 2 - Cromatografia em DEAE-celulose	17
Fig. 3 - Efeito da Concentração da Enzima	18
Fig. 4 - Efeito do Tempo e Concentração da Enzima	19
Fig. 5 - Efeito da Temperatura	21
Fig. 6 - Inativação Térmica	22
Fig. 7 - Efeito do pH e composição do tampão	23
Fig. 8 - Efeito da Concentração de L-fucose - Determinação da Constante de Michaelis-Menten (Km)	31
Fig. 9 - Efeito da Concentração de NAD - Determinação da Constante de Michaelis-Menten (Km)	32
Fig. 10 - Efeito do pH sobre V_{max} e Km	33
Fig. 11 - Efeito do pH sobre V_{max} e Km	34
Fig. 12 - Efeito de Inibição pelo NADH	36
Fig. 13 - Efeito de Inibição pelo NADH	37
Fig. 14 - Cromatografia do Produto de Oxidação da L-fucose	40
Tab. I - Purificação da L-fucose Desidrogenase	14
Tab. II - Especificidade (L-aldoses)	25
Tab. III - Especificidade (D-aldoses)	26
Tab. IV - Efeito da presença de L-glactose e D-arabinose na atividade da L-fucose desidrogenase	26
Tab. V - Efeito de reagentes orgânicos	28
Tab. VI - Efeito de reagentes inorgânicos	29
Tab. VII - Formação de hidroxamato durante a oxidação da L-fucose	39

I N T R O D U Ç Ã O

L-fucose (6-desoxi-L-galactose) é de ampla ocorrência na natureza. É encontrada principalmente como componente estrutural de grande variedade de macromoléculas de importância biológica sintetizadas por microrganismos, plantas e animais. O estudo de seu metabolismo tem sido bastante explorado nos últimos anos.

A presença de L-fucose tem sido verificada em oligossacarídeos do leite (1, 2), substâncias dos grupos sanguíneos humanos (3), mucoproteínas do plasma e urina (4), em material capsular bacteriano (5) e, também, como componente de certos lipídios (6).

Níveis elevados de glicoproteínas contendo L-fucose são encontrados no plasma de diabéticos (7) e em portadores de hepatite epidêmica (8). No último caso, a excreção de fucoglicoproteínas pela urina e saliva é menor do que em indivíduos normais.

A partir do ano de 1956, intensivos estudos foram realizados com a finalidade de esclarecer os processos de biossíntese da L-fucose e de outros compostos que a contêm como elemento estrutural (9 - 23).

HEATH & ROSEMAN (9), 1958, trabalhando com Aerobacter cloacae, verificaram que quando este microrganismo era crescido em D-glucose-1-C¹⁴ como fonte de carbono, L-fucose-1-C¹⁴ era encontrada como componente de um polissacarídio extracelular excretado no meio de cultivo, mas quando as células eram crescidas em meio contendo D-glucose-6-C¹⁴, apenas L-fucose-6-C¹⁴ era encontrada no polissacarídio, confirmando os re-

sultados anteriormente obtidos por SEGAL & TOPPER (10) e WILKINSON (11) em Aerobacter aerogenes e Klebsiella aerogenes, respectivamente. Estes autores propuseram uma via para a biossíntese deste desoxiaçúcar, diretamente a partir de D-glucose, sem envolvimento de inversão nem rompimento da cadeia. Os mesmos resultados foram também verificados no homem (12).

Em estudos enzimáticos, GINSBURG (13) obteve uma preparação de Aerobacter aerogenes capaz de transformar GDP-D-manose em GDP-L-fucose, tendo NADPH como cofator, possivelmente via um intermediário do tipo GDP-4-ceto-6-desoxihexose. A reação inversa foi verificada a partir de L-fucose-1-fosfato.

A identificação de GDP-D-manose e GDP-L-fucose no leite e em glândulas mamárias (14 - 16), sugeria a ocorrência de uma via biossintética semelhante em tecidos animais, o que foi demonstrado por FOSTER & GINSBURG (18).

Por outro lado, pouca atenção foi dada ao mecanismo de degradação da L-fucose. EAGON (24) verificou que diversos microrganismos são capazes de utilizar L-fucose como fonte de carbono. No entanto, a via de degradação de L-fucose foi completamente estudada somente em Escherichia coli (25 - 28).

A isomerização de L-fucose a L-fuculose foi primeiramente observada por GREEN & COHEN (25) em extrato livre de células de Escherichia coli crescidas em meio mineral contendo apenas L-fucose como fonte de carbono. A fosforilação da L-fuculose a L-fuculose-1-fosfato foi, em seguida, evidenciada por MILLER & HUANG (26) no mesmo microrganismo em condições de trabalho semelhantes. Esta via foi posteriormente completada com a purificação e caracterização da enzimas L-fuculose-1-quinase e L-fuculose-1-fosfato aldolase por HEATH & GHALAMBOR (27 - 28).

Uma via de degradação semelhante encontra-se descrita por WILSON et alii (29, 30) para L-rhamnose, também em Escherichia coli.

O mecanismo pelo qual L-fucose é degradada até gás carbônico em mamíferos ainda não é conhecido. Experimentos "in vivo" no homem e em animais de laboratório demonstraram diferenças na capacidade de metabolizar L-fucose. Seguindo-se à administração de L-fucose- $l\text{-C}^{14}$ a seres humanos (12), mais ou menos 40% da radioatividade total é eliminada como gás carbônico em um período de 6 horas. Em ratos, nas mesmas condições, menos de 2% da radioatividade é eliminada como gás carbônico, enquanto 30% aparece na urina como L-fucose inalterada (20, 23). O significado fisiológico desta diferença ainda hoje não se acha esclarecido.

ROSEMAN et alii (31) descreve uma desidrogenase de L-fucose, NAD-dependente, extraída de fígado de porco, que oxida este desoxiaçúcar diretamente a ácido L-fucônico. A mesma enzima também é encontrada em fígado de carneiro (32). Estes autores sugerem que esta enzima catalisa o primeiro passo da via oxidativa de degradação da L-fucose em animais, possivelmente por um mecanismo análogo à via de ENTNER-DOUDOROFF-WOOD (33) para a degradação de aldohexoses em bactérias. Recentemente, MOBLEY (34) relata a presença de L-fucose desidrogenase no fígado de outras espécies de vertebrados.

CLINE & HU (35 - 38) isolaram de um mutante de Pseudomona saccharophila um sistema de três aldose desidrogenases, entre as quais, uma D-arabinose desidrogenase, específica para açúcares que apresentam a configuração ótica da L-galactose, portanto, ativa com L-fucose e L-galactose, porém, relati-

vamente inespecífica com relação à coenzima, podendo utilizar tanto o NAD como o NADP.

DAHMS & ANDERSON (39 - 42), 1972, demonstraram uma via de degradação para D-fucose em uma bactéria da família das Pseudomonadales capaz de utilizar esta desoxihexose como fonte de carbono, que também envolve a ação de uma D-aldose desidrogenase, NAD-dependente e específica para D-aldoexoses, oxidando-as a delta-D-aldonolactona correspondente. Uma segunda enzima, L-arabino-desidrogenase, NAD(P)-dependente, oxida a forma furanósica de D-aldoses a gama-D-aldonolactonas que posteriormente são hidrolisadas por ação de uma lactonase. O ácido D-fucônico formado é desidratado por uma desidrase dando o ácido 2-ceto-3-desoxi-D-fucônico que em reação subsequente é clivado em ácido pirúvico e D-lactaldeído por ação de uma aldolase.

O trabalho aqui apresentado descreve pela primeira vez a ocorrência de uma L-fucose desidrogenase em fungos, mais especificamente em Pullularia pullulans.

Os estudos preliminares foram feitos por VEIGA et alii (43), que verificaram que Pullularia pullulans era capaz de utilizar adaptativamente L-fucose como fonte de carbono, porém, não sendo constatada a presença de nenhuma das enzimas participantes da via de degradação deste desoxiaçúcar encontrada em Escherichia coli. No entanto, extratos livres de células deste fungo era capaz de reduzir NAD em presença de L-fucose, sendo identificado o ácido L-fucônico como produto.

M A T E R I A I S E M É T O D O S

REAGENTES:

Os reagentes químicos usados nos ensaios referidos neste trabalho foram sempre produtos puros obtidos das melhores fontes comerciais.

L-fucose, gama-L-galactonolactona, NAD, NADH (sal dissódico), NADP, NADPH (sal dissódico) e peroxidase (horseradish, RZ aproximadamente 0,44) foram obtidos de Sigma Chemical Company. NADH e NADPH foram dissolvidos no momento de uso em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,5.

Os inibidores de grupamentos tiois: p-cloromercu-ribenzoato de sódio, ácido p-cloromercuribenzeno sulfônico, ácido p-hidroximercuribenzoico, ácido 2-cloro-4-aminobenzoico e ácido o-iodosobenzoico (Sigma Chemical Co.) foram dissolvidos em hidróxido de sódio 0,1M e neutralizados com ácido clorídrico 0,1M até pH 8,5. Tetracionato de sódio foi preparado segundo LIU & INGLIS (44).

Ditioeritritol (Sigma Chemical Co.) e 2-mercapto-etanol (Matheson Coleman) foram usados como protetores sempre na concentração final de $10^{-3}M$, a não ser quando indicado.

L-galactose foi preparada a partir da gama-L-galactonolactona por redução com boridreto de sódio em pH que variava entre tres e quatro e em temperatura não superior a $4^{\circ}C$, segundo WOLFROM & ANNO (45). Após a eliminação de borato por concentração a vácuo em metanol, a mistura foi desionizada em coluna mista (60 ml) contendo equivalentes quantidades de

resina AG 50W-X8 (H^+) e AG 1-X8 (OH^-), 50-100 mesh (Bio-Rad), concentrada a vácuo até xarope, cristalizada em mistura de metanol-2-propanol e recristalizada em metanol, $[\alpha]_D^{20} = 79$ (c 3,6 em água), $[\alpha]_D^{20}$ para L-galactose = 80° (c 4,0 em água).

O produto foi identificado como L-galactose segundo FRUSH & ISBELL (46) através do derivado L-galactosemetilfenilhidrazona (ponto de fusão $186^\circ C$, ponto de fusão obtido $186^\circ C$). Na preparação não é excluída a presença de pequena quantidade de galactitol como contaminante.

Ácido L-fucônico (sal de sódio) foi preparado por oxidação da L-fucose com iodo em metanol, segundo MOORE & LINK (47) e caracterizado como L-fuconobenzimidazol, ponto de fusão $254^\circ C$, ponto de fusão obtido $255^\circ C$. Gama-L-fuconolactona foi obtida por oxidação com bromo em água, segundo CLARK (48) e caracterizada como o ácido correspondente conforme ROSEMAN & HEATH (49).

CONDIÇÕES DE CULTURA:

A amostra de Pullularia pullulans, isolada de sapoti, nos foi cedida pela Dr^a S. Joli, do Instituto Zimotécnico da Universidade de São Paulo, e foi mantida em meio sólido de Sabouraud, com glucose 1%.

As células foram adaptadas à utilização de L-fucose como fonte de carbono, através de repicagens sucessivas em meio mineral sólido contendo L-fucose 0,5% alternadas com crescimento em meio mineral líquido contendo a mesma concentração de L-fucose, trabalho realizado por NAKANO et alii (50).

O microrganismo utilizado neste trabalho, já se

encontrava adaptado ao consumo de L-fucose como fonte de carbono, e foi mantido em meio mineral sólido (1,75% de agar em meio mineral com 0,5% de L-fucose), incubando-se as culturas durante 45 a 50 horas a 28°C. Foi evitado sempre o enegrecimento das culturas, conforme recomendado (50).

Nas repicagens de meio meio sólido para meio líquido, as células de Pullularia pullulans foram suspensas diretamente nos tubos de cultura em meio mineral sólido, usando-se 3 ml de meio mineral líquido estéril e transferindo-se a suspensão para frasco "Erlenmeyer" contendo 250 ml de meio mineral com L-fucose 0,5%. A cultura foi incubada aerobicamente a 28°C, em agitador rotatório a 100 rpm durante 25 a 30 horas. Desta cultura, alíquotas de 25 ml foram transferidas para frascos "Erlenmeyer" de 2 litros contendo 500 ml de meio mineral e L-fucose na concentração indicada, incubados nas mesmas condições, por 45 a 50 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada e lavadas três vezes com solução de cloreto de potássio 0,154M.

O meio mineral líquido usado (pH 5,6) continha por litro, os seguintes componentes: 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, 1,2 g de KH_2PO_4 , 0,14 g de Na_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g de KCl, 0,5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl_2 , 0,0144 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,0088 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 0,004 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,003 g de CuCl_2 , 0,000064 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 1 g de extrato de levedura. L-fucose, em concentração de 25%, foi esterilizada separadamente em vapor fluente durante 20 minutos e adicionada assepticamente ao meio mineral em quantidade suficiente para uma concentração final de 0,5%.

MÉTODOS ANALÍTICOS:

A concentração de proteínas foi geralmente determinada pelo método de WARBURG & CHRISTIAN (51) exceto nas etapas iniciais do processo de purificação em que foi usado o método de LOWRY et alii (52). Albumina bovina (Sigma) foi utilizada como padrão.

Ácidos aldônicos foram quimicamente determinados após conversão às lactonas correspondentes, por fervura durante 5 minutos em HCl 1M. As lactonas, por sua vez, foram determinadas pelo método de HESTRIN (53).

Cromatografia em papel foi desenvolvida em papel cromatográfico Whatman nº 1, e os seguintes solventes foram utilizados: Solvente I: Butanol:piridina:água (6:4:3, v/v) e Solvente II: Benzeno:butanol:piridina:água (1:5:3:3, v/v) (54).

Açúcares redutores foram visualizados com nitrato de prata alcalino, segundo TREVELIAN (55) ou pelo método da p-anisidina-periodato (56); lactonas e ácidos aldônicos foram revelados como hidroxamatos conforme ABDEL-AKHER (57), os últimos após lactonização "in situ".

Medidas polarimétricas foram feitas em polarímetro Perkin Elmer, modelo 141, a 20°C. As determinações de ponto de fusão foram feitas em aparelho Kofler Reichert.

Eletroforese analítica foi feita em gel de poliacrilamida a 8% com sistema descontínuo de tampão TRIS-borato pH 9,0, em sistema de eletroforese ORTEC, modelo 4200, a 300 volts e 5 mA^o por tubo, seguindo-se as instruções gerais de DAVIS (58) e usando-se as formulações de geis e tampões descritas no manual de instruções ORTEC (59). Coloração para proteínas foi feita com Amido Black (Amidoschwarz 10B, Merk) segundo GABRIEL (60).

A atividade de L-fucose desidrogenase no gel foi detectada por imersão durante 30 minutos, em temperatura ambiente, na seguinte mistura: Fenazina metassulfato 0,014%, azul de p-nitrofenil-tetrazólio 0,08%, NAD 6 mM, L-fucose 30 mM e tampão TRIS-HCl pH 8,5 10 mM.

Ensaio padrão para L-fucose desidrogenase: A atividade enzimática de L-fucose desidrogenase foi medida espectrofotometricamente, seguindo a redução do NAD a 340 milimicra em espectrofotometro BECKMAN, modelos DB ou DU-2 com registrador acoplado, à temperatura de 28°C durante 3 minutos.

A não ser quando indicado, a mistura de reação usada (1 ml) continha: 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 10 micromoles de L-fucose, 1 micromol de NAD e quantidades indicadas de enzima (20 a 50 microlitros), sendo a reação iniciada com a adição da enzima.

A não ser nas etapas de purificação, os ensaios de caracterização foram feitos com enzima purificada.

Uma unidade de L-fucose desidrogenase foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a redução de 1 micromol de NAD por minuto, nas condições de reação citadas.

No ensaio da temperatura ótima, a mistura de reação foi previamente incubada em banho-maria na temperatura indicada durante 10 minutos sendo a reação iniciada com a adição da enzima. No estudo da inativação pelo calor, a enzima foi incubada em banho-maria a 40°C e a atividade foi determinada nos tempos indicados.

Na mistura de reação para o isolamento do produto da reação, foi usado o sistema peroxidase-resorcinol para a

regeneração do NAD, segundo a técnica citada por AKAZAWA & CONN (61). Uma mistura de reação contendo 4 milimoles de L-fucose, 50 micrómoles de NAD, 10 micromoles de H_2O_2 , 1 milimol de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 50 microgramas de peroxidase, 0,5 micromoles de resorcinol e 200 microgramas de L-fucose desidrogenase, num volume final de 20 ml, foi incubada durante 4 horas a 25°C. A reação foi parada por adição de 80 ml álcool absoluto e o precipitado foi separado por centrifugação a 15000 rpm durante 20 minutos. O material foi concentrado a vácuo até aproximadamente 5 ml e passado por coluna de DOWEX 1-X8 (Bio-Rad) 200-400 mesh, forma formiato (1,5 x 15 cm). L-fucose residual foi recuperada por lavagem com 100 ml de água e o produto da reação foi eluido usando um gradiente de ácido fórmico (200 ml de água e 200 ml de ácido fórmico 1M). A eluição foi acompanhada pela reação de HESTRIN (53), e o eluato foi concentrado a vácuo até pequeno volume.

PURIFICAÇÃO DA L-FUCOSE DESIDROGENASE:

a) Estudos iniciais com extrato livre de células:

As condições de extração da enzima foram estudadas visando a obtenção de preparação mais ativa e estável possível, dentro das condições de trabalho. Tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,5 foi o usado para a extração da enzima ao invés do tampão glicina-hidróxido de sódio pH 10 (pH ótimo), por conferir maior estabilidade à enzima frente ao estocamento a -20°C.

A presença de $MgCl_2$, NaF, EDTA e 2-mercaptoetanol não mostrou sensíveis alterações na atividade inicial nem na estabilidade da enzima durante a estocagem. Entretanto, foi verificado que metais pesados como ferro e cobre possuíam ação

inibitória. EDTA e 2-mercaptoetanol foram mantidos nas etapas de purificação, na concentração de $10^{-3}M$, a não ser quando indicado. Nestas condições, pequena perda de atividade foi observada após 1 mês de estocamento a $-20^{\circ}C$.

Cofatores e substratos endógenos foram eliminados através de filtração do extrato livre de células em colunas de gel-Sephadex G-50, de volume igual a 3 a 4 vezes o volume do extrato.

b) Preparação do extrato livre de células: Para cada preparação, cerca de 20 gramas de células de Pullularia pullulans (peso úmido) crescidas em meio mineral líquido (5 litros) contendo L-fucose 0,5%, foram maceradas em gral de porcelana com o mesmo peso de "glass beads", tipo 090-5005 (Minnesota Mining & Manufacturing Co.).

A enzima foi extraída com tampão TRIS-HCl 0,05 M pH 8,5 contendo EDTA e 2-mercaptoetanol, ambos na concentração de $10^{-3}M$. Foram adicionados 2 ml desta mistura para cada grama de células. O extrato livre de células foi separado por centrifugação a 15000 x g durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada INTERNATIONAL, modelo PR-2. Todas as operações foram feitas entre zero e $4^{\circ}C$.

c) Tratamento com sulfato de protamina: Ao extrato livre de células (42 ml) foi adicionado solução de sulfato de protamina 2%, pH 7, em quantidade suficiente para uma concentração final de 0,3%. Após 30 minutos, o precipitado foi separado por centrifugação a 15000 x g durante 20 minutos e desprezado.

d) Fracionamento com sulfato de amônio: Ao sobrenadante da etapa anterior (49 ml) foi adicionado sulfato de

amônio sólido até 40% de saturação. Após 30 minutos, o precipitado de proteínas foi separado por centrifugação a 15000 g durante 20 minutos e desprezado. No sobrenadante resultante (53 ml), a concentração de sulfato de amônio foi elevada até 60% de saturação. O precipitado foi coletado da mesma maneira e dissolvido em 2,5 ml de tampão TRIS-HCl 0,05M, pH 8,5 contendo 2-mercaptoetanol e EDTA na concentração de 10^{-3} M. Esta fração continha a maior parte da atividade enzimática inicial.

e) Filtração em gel: 2,0 ml da fração obtida foram aplicados em coluna de 2,0 x 60 cm de Sephadex G-100 (Pharmacia-Upsala) previamente equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,5 com 10^{-3} M em EDTA e 2-mercaptoetanol. A eluição da enzima foi feita com a mesma mistura, sendo coletadas frações de 2 ml em coletor de frações BECKMAN, modelo 132, munido de unidade de refrigeração BECKMAN, modelo 133.

As frações de maior atividade específica foram reunidas e usadas na etapa de purificação seguinte.

f) Cromatografia em DEAE-celulose: A fração resultante do tratamento com gel (16 ml) foi aplicada em coluna de 1,5 x 17 cm de DEAE-celulose (Sigma), com capacidade de troca de 0,98 mEq/g, preparada conforme SOBER et alii (62) e previamente equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,5 contendo EDTA e 2-mercaptoetanol, ambos 10^{-3} M.

A coluna foi inicialmente lavada com 40 ml de NaCl 0,05M em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,5 contendo EDTA e 2-mercaptoetanol na concentração de 10^{-3} M. A enzima foi eluída com um gradiente linear de cloreto de sódio no mesmo tampão (0,05M a 0,5M, somando 400 ml). Foram coletadas frações de 2,5 ml em coletor de frações BECKMAN, modelo 132, refrigerado com unidade de re-

irrigeração BECKMAN, modelo 133. As frações de maior atividade específica foram reunidas e submetidas a eletroforese analítica em gel de poliacrilamida para critério de pureza.

ABREVIACÕES USADAS

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.

HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano sulfônico.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada).

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida).

NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma oxidada).

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida).

R E S U L T A D O S

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA:

As figuras 1 e 2 mostram os resultados das etapas de purificação da L-fucose desidrogenase por filtração em gel-Sephadex e por cromatografia em DEAE-celulose, respectivamente. Os resultados do processo total de purificação estão expressos na tabela I, que mostra que a enzima foi purificada 228 vezes em relação ao extrato livre de células inicial.

TABELA I

PURIFICAÇÃO DA L-FUCOSE DESIDROGENASE

TRATAMENTOS	Proteína (mg/ml)	Unidades por ml	Total de unidades	At.espe cífica*	Rendi- mento*	Purifi- cação
EXTRATO BRUTO	15,7	0,19	7,96	12,2	-	-
SULFATO DE PROTAMINA	9,46	0,128	6,27	13,6	78,7	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-60% SAT.	8,00	1,77	4,42	221	55,7	18
SEPHADEX G-100	0,33	0,35	4,24	1071	53,2	88
DEAE-CELULOSE	0,048	0,134	1,60	2791	20,1	228

* A atividade específica é expressa em unidades de enzima por mg de proteína x 1000 e rendimento em % da atividade enzimática presente no extrato livre de células.

As frações de maior atividade específica reunidas após a cromatografia em DEAE-celulose (12,5 ml) foram submetidas a teste de pureza em gel de poliacrilamida. A análise eletroforética desta fração mostrou a presença de apenas uma ban-

da de proteína, coincidente em mobilidade com a obtida por coloração específica para L-fucose desidrogenase.

Esta preparação foi usada como fonte de enzima para os testes de caracterização.

PROPORCIONALIDADE DA ENZIMA:

A quantidade de NAD reduzido pela L-fucose desidrogenase é proporcional ao tempo de incubação e à concentração da enzima (Figuras 3 e 4).

Perda da proporcionalidade ocorre em concentrações de enzima superiores a 20 microgramas por mililitro, em um tempo de reação de 5 minutos ou em concentrações mais baixas, mas em tempos de incubação maiores, o que se deve ao efeito inibitório do NADH formado, conforme está discutido adiante.

EFEITO DA TEMPERATURA:

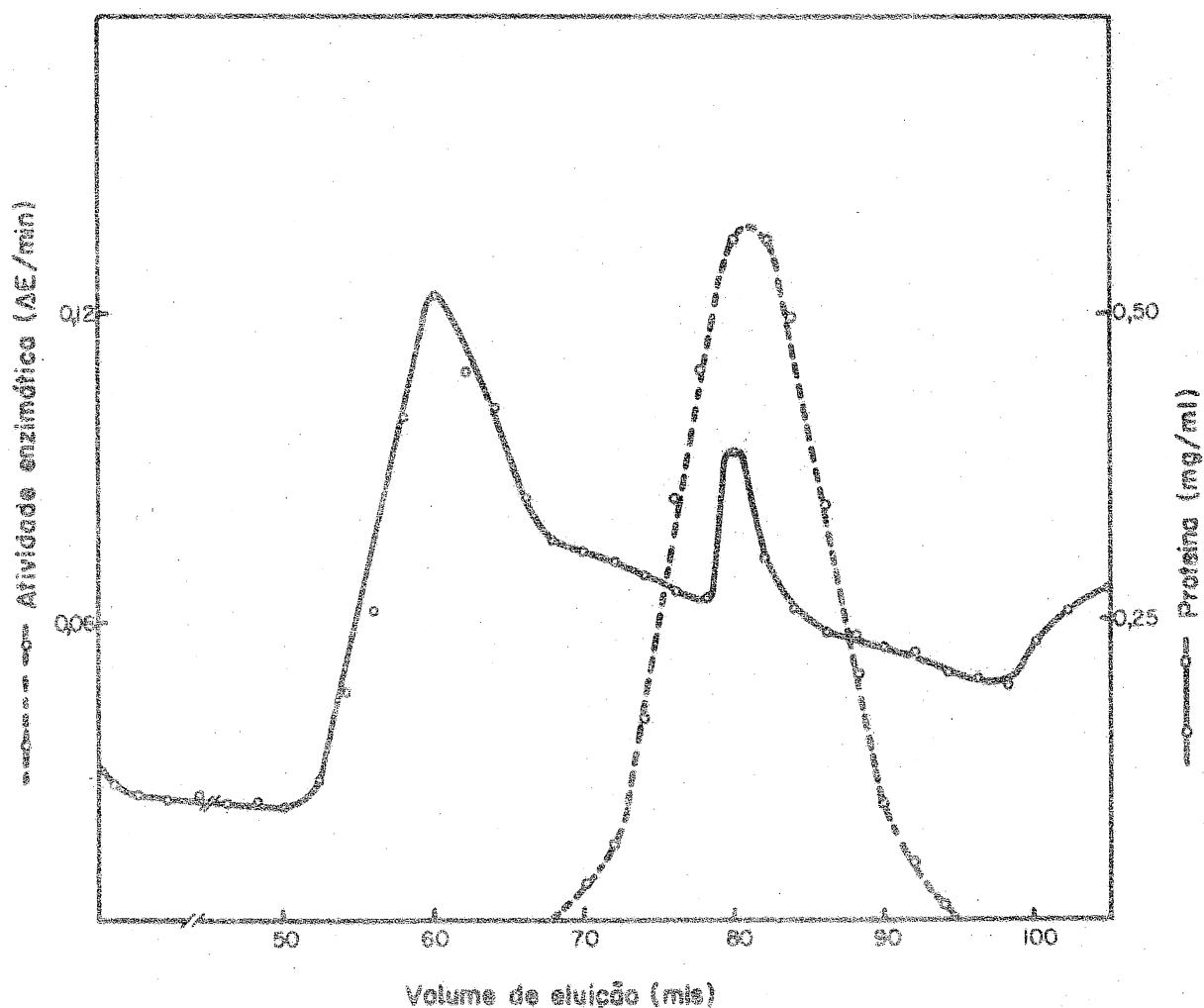
O efeito da temperatura de incubação sobre a L-fucose desidrogenase é indicado na figura 5.

A temperatura ótima para a reação está em torno de 30°C. A enzima é inativada irreversivelmente após aquecimento durante 10 minutos à temperatura de 50°C, tanto em presença de NAD como em presença de L-fucose.

O efeito da inativação pelo calor a 40°C é mostrado na figura 6. A presença de NAD, na concentração de 1 mM, tem efeito protetor contra a inativação pelo calor, o que não ocorre quando a L-fucose está presente no meio de incubação. Após 15 minutos de aquecimento a 40°C, a enzima conserva ainda 40% da atividade quando em presença de NAD. Nestas mesmas con

Figura 1

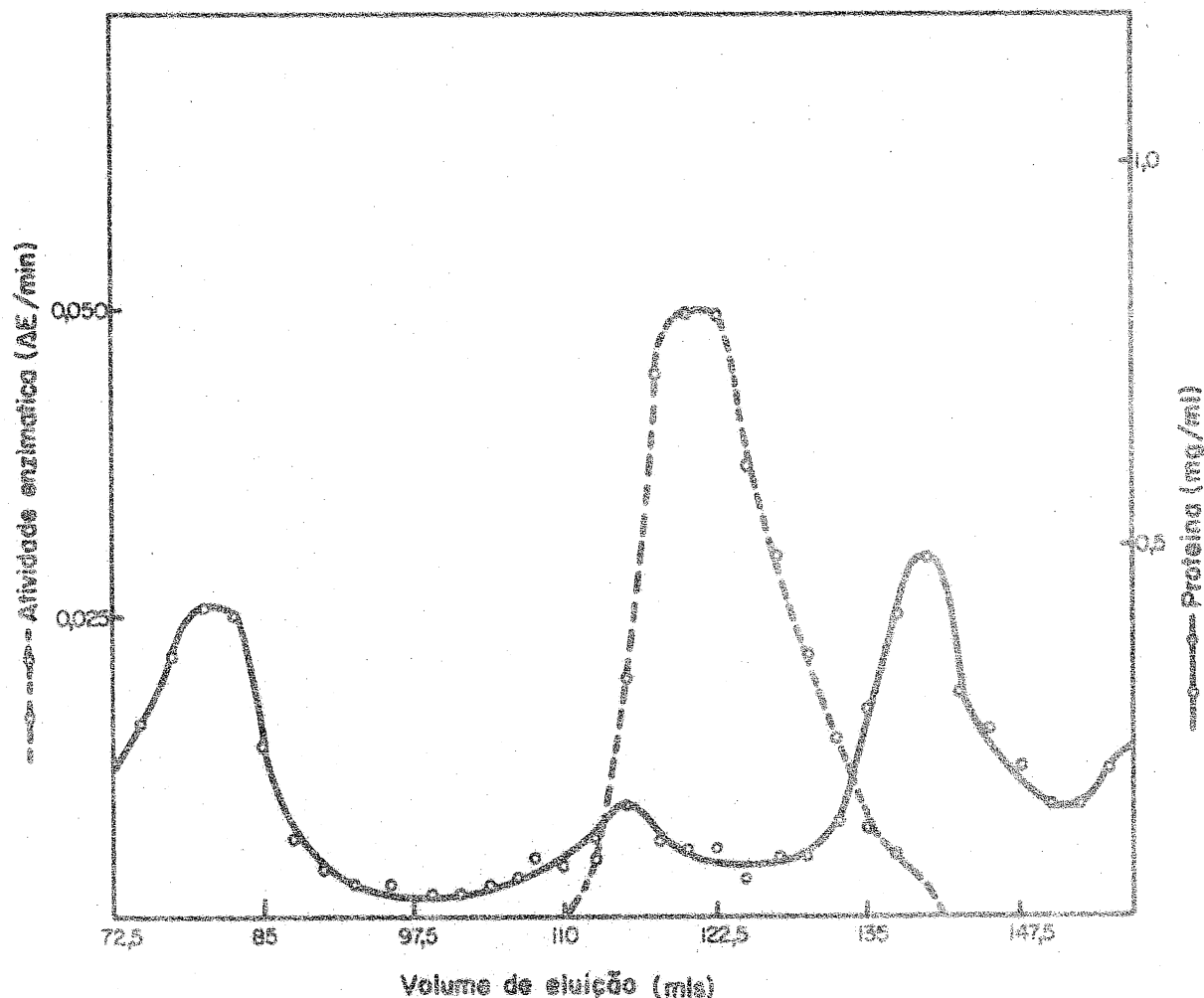
Filtração em Gel Sephadex G-100



A enzima foi eluída da coluna com tampão TRIS-HCL 0,05M pH 8,5 contendo EDTA e 2-mercaptoetanol 10^{-3} M, fluxo de 0,2 ml por / minuto, sendo coletadas frações de 2 ml. A atividade enzimática foi medida usando-se 50 microlitros de cada fração conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 2

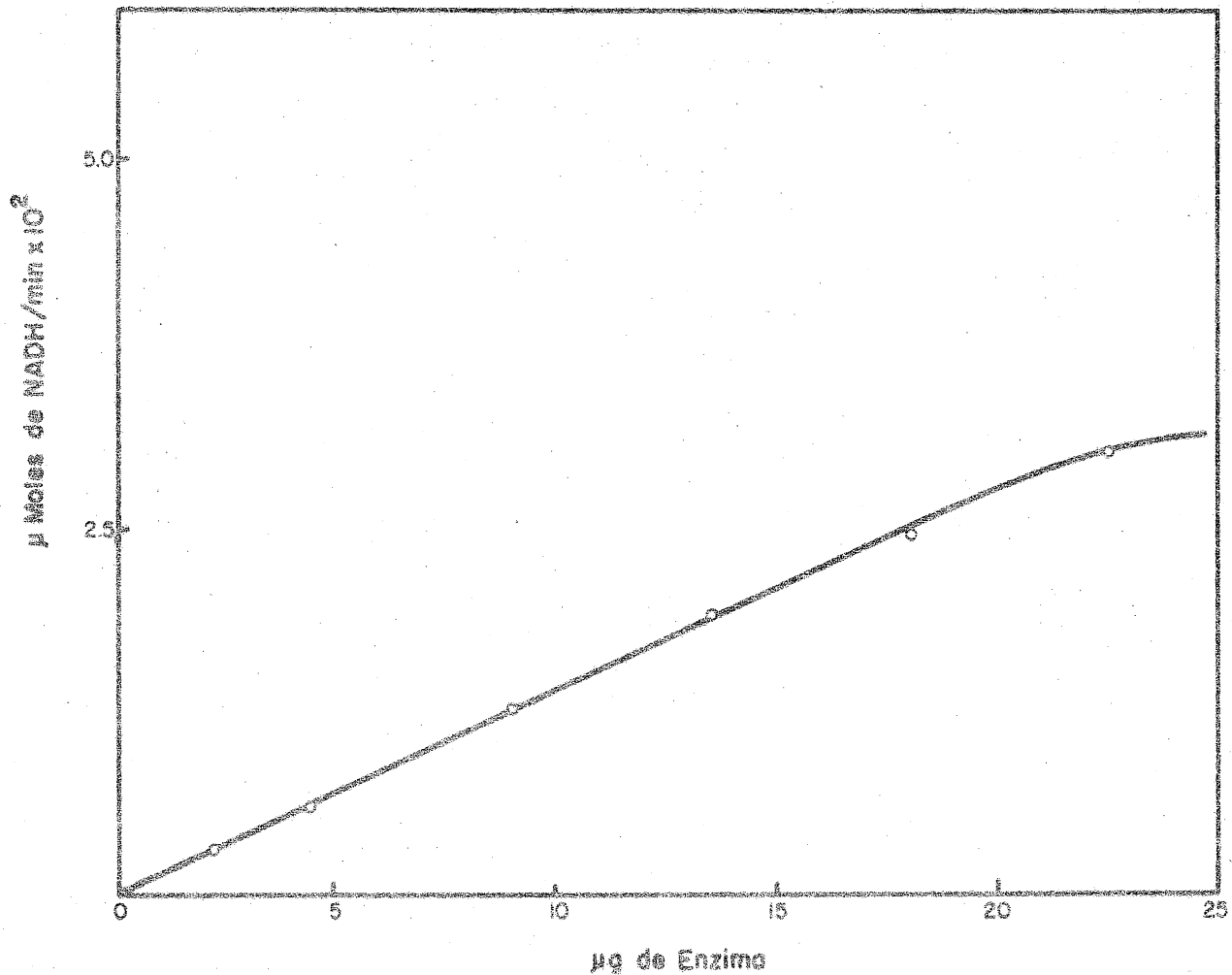
Cromatografia em DEAE - celulose



A enzima foi eluída da coluna conforme descrito em Materiais e Métodos, com fluxo de 0,3 ml por minuto, sendo coletadas frações de 2,5 ml. A atividade da enzima foi medida, usando-se / alíquotas de 50 microlitros de cada fração.

Figura 3

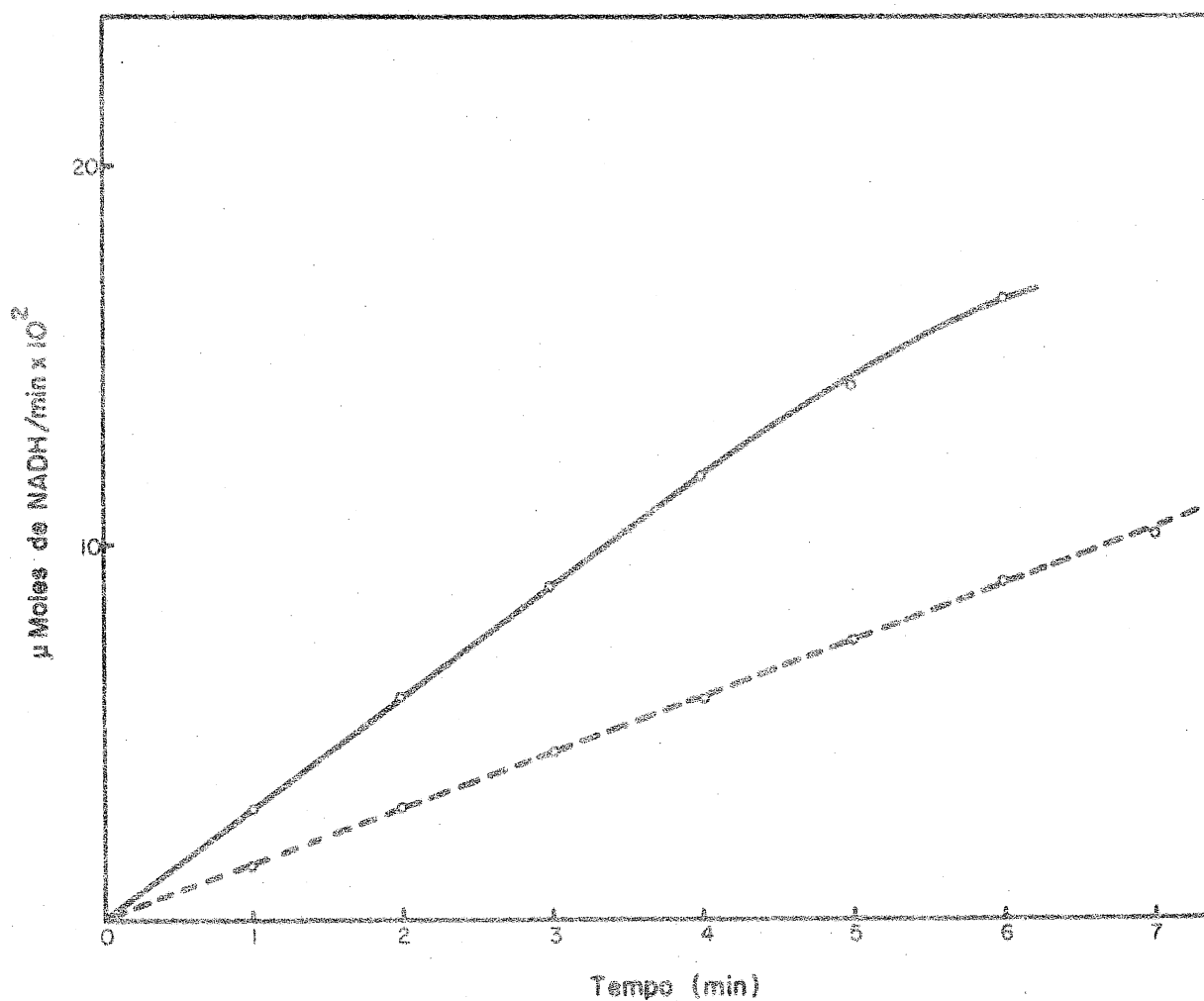
Efeito da Concentração da Enzima



Sistema de incubação (1 ml): 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 2 micromoles de NAD, 20 micromoles de L-fucose e as quantidades indicadas de enzima. A redução do NAD foi seguida continuamente a 340 milimica em espectrofotômetro "Beckman" modelo DB, a 28°C, durante 3 minutos.

Figura 4

Efeito do Tempo e Concentração da Enzima



O sistema de reação usado foi o mesmo descrito na figura anterior, exceto para as quantidades indicadas de enzima (—○— 20 μg de enzima e -○- -○- 10 μg de enzima.)

dições, menos de 10% da atividade permanece quando a enzima é aquecida em presença de L-fucose 10 mM. NAD e L-fucose juntos, 1 e 10 mM, respectivamente, não apresentam nenhuma proteção adicional.

A 30°C, menos de 30% de atividade é perdida após 1 hora de incubação em presença de NAD 1 mM.

EFEITO DO pH E COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO:

O efeito do pH sobre a atividade da L-fucose desidrogenase foi verificado na faixa de pHs compreendida entre 6,0 e 10,8, usando tampões fosfato, TRIS-HCl, glicina-hidróxido de sódio e carbonato, todos na concentração final de 40 mM.

A figura 7 mostra a forte dependência da atividade enzimática com a variação do pH de incubação. Máximas atividades foram obtidas em pH 10,2, com pequena variação entre o tampão carbonato e glicina-NaOH.

Em pHs imediatamente superiores a 10,2, a enzima passa ser inativada irreversivelmente. A inativação se processa rapidamente em pH 10,8, logo após o primeiro minuto de incubação a 28°C, sendo que após 5 minutos a atividade baixa aproximadamente a zero.

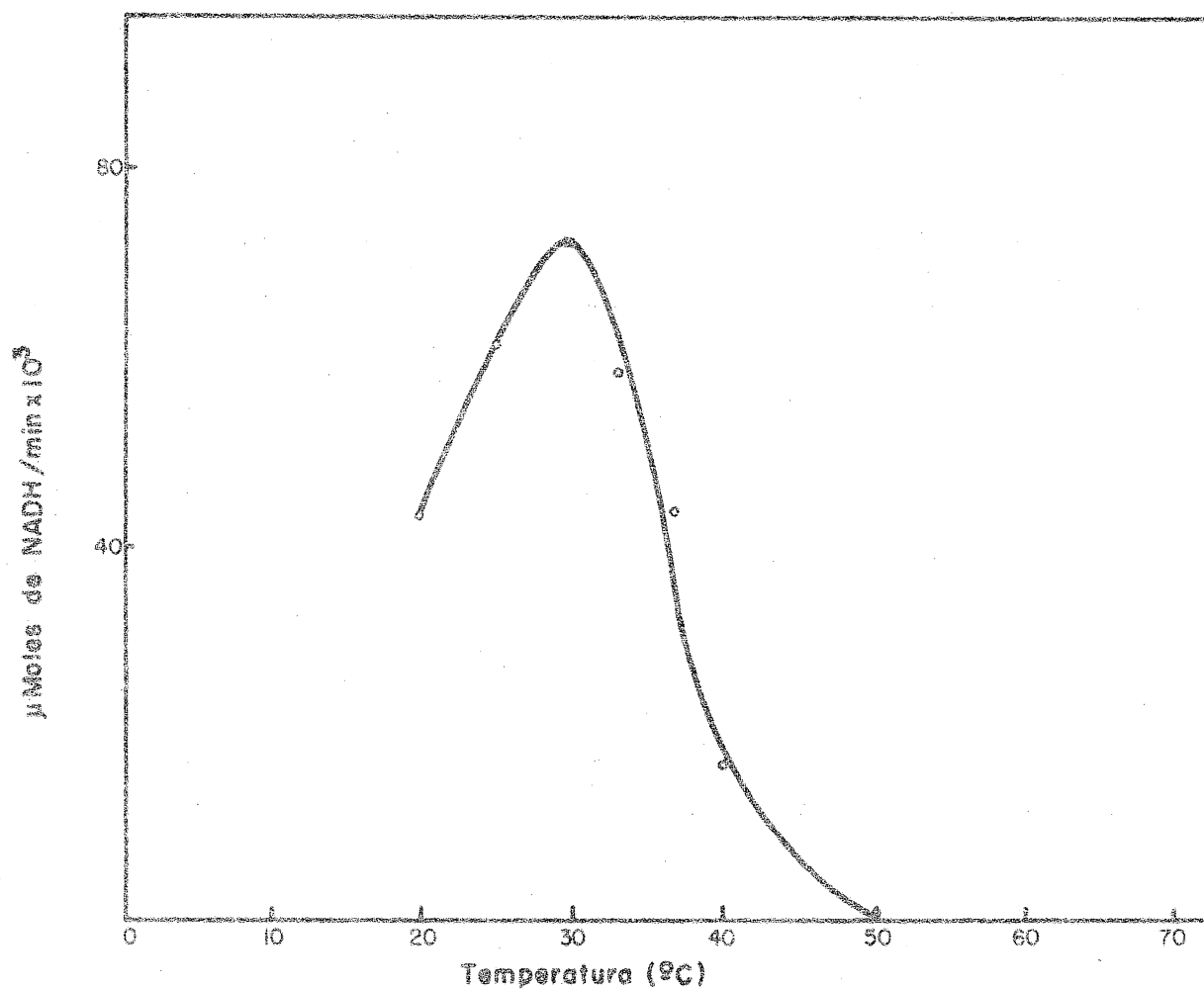
O efeito do pH sobre as constantes cinéticas K_m e V_{max} é apresentado nas figuras 10 e 11.

ESTABILIDADE DA ENZIMA:

A enzima purificada perde rapidamente a atividade mesmo em presença de reagentes protetores de grupamentos tiois. Submetida à diálise contra tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,5 duran-

Figura 5

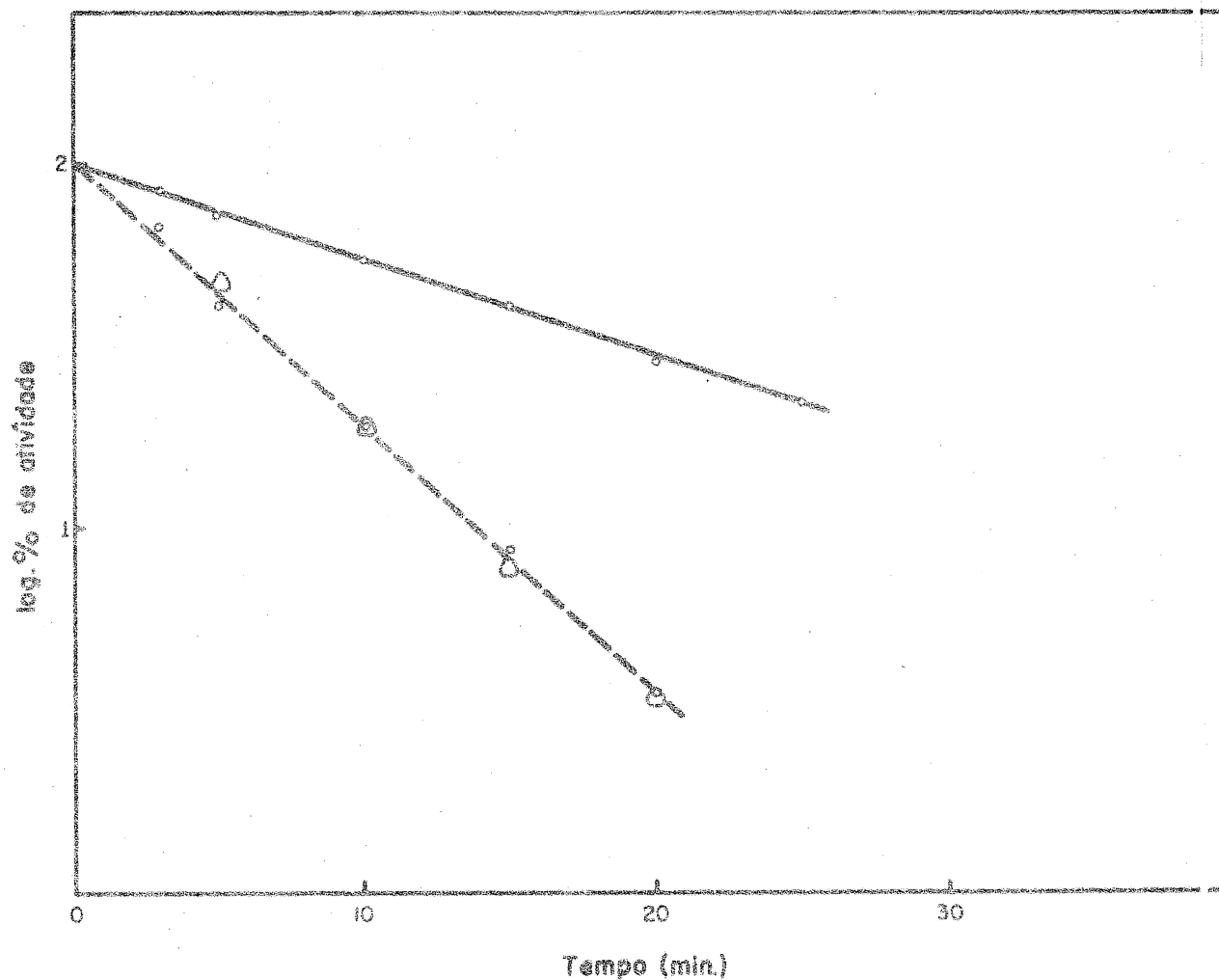
Efeito da Temperatura



O sistema de reação foi previamente incubado na temperatura indicada durante 10 minutos, sendo a reação iniciada com a adição de 4,5 microgramas de enzima. O sistema de reação / (1ml) continha 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 10 micromoles de L-fucose e 1 micromol de NAD.

Figura 6

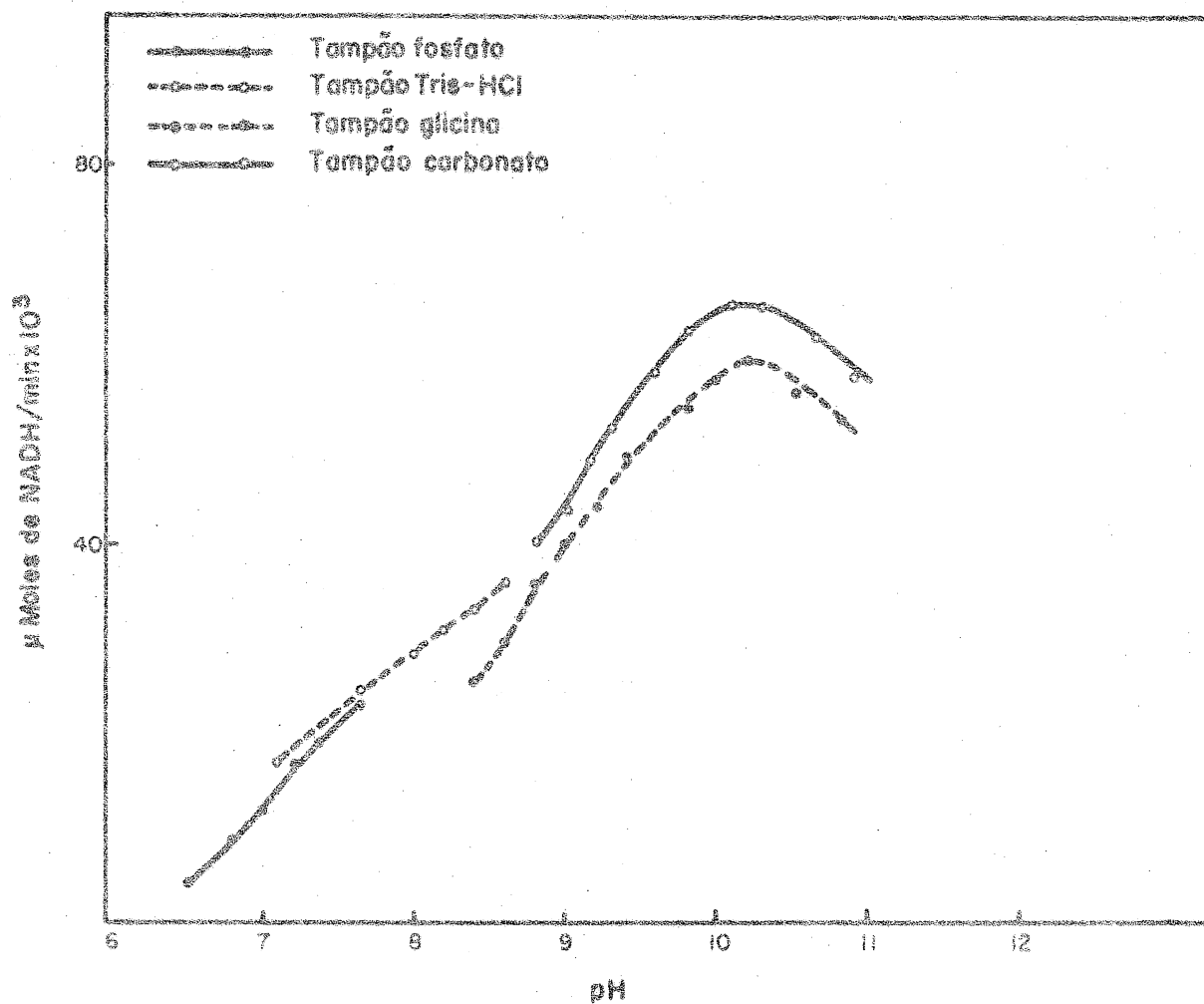
Inativação Térmica da L-Fucose Desidrogenase



A enzima (100 microgramas) em tampão TRIS-HCL 0,05 M pH 8,5, foi aquecida em banho-maria a temperatura de 40°C, em presença de NAD ou L-fucose. A atividade da enzima foi medida nos tempos indicados, usando-se para cada determinação, alíquotas contendo 10 microgramas de enzima. (—○— em presença de NAD 1mM; —○— em presença de L-Fucose 1 x 10⁻² M; —△— em ausência de L-Fucose.)

Figura 7

Efeito do pH e Composição do Tampão



Sistema de incubação (1 ml): 30 micromoles de L-fucose, 2 micromoles de NAD, 20 microgramas de enzima e 20 micromoles do tampão indicado. A redução do NAD foi seguida continuamente a 340 milimicra em espectrofotômetro "Beckman" modelo DU-2 com registrador acoplado, à temperatura da câmara do aparelho (28°C)

te 4 horas, resulta na perda de mais de 80% da atividade inicial. A adição de 2-mercaptoetanol, ditioeritritol ou EDTA ao meio de diálise (na concentração de 5 mM) também não aumenta a estabilidade da enzima.

Congelada a -20°C em presença de NAD e ditioeritritol (1 mM), a enzima conserva mais de 50% de atividade após um mês de estocamento. Nas mesmas condições, mas a 4°C , 90% da atividade é perdida após dois dias.

ESPECIFICIDADE DA L-FUCOSE DESIDROGENASE:

Foi estudada a especificidade da enzima, substituindo-se L-fucose no sistema de incubação padrão por uma série de D- e L-aldoses, nas concentrações indicadas nas tabelas II e III.

Dentre todos os açúcares testados, apenas L-galactose serviu como substrato para a enzima, porém, a atividade da L-fucose desidrogenase com esta L-aldohexose é muito menor que a obtida com a L-fucose. Os mesmos açúcares quando testados na concentração de 50 mM, em presença de L-fucose, não apresentam qualquer fenômeno de inibição, com exceção da L-galactose que aparentemente compete com a L-fucose (Tabela IV).

Com relação ao cofator, a L-fucose desidrogenase é estritamente dependente de NAD. NADP não serve como coenzima mesmo em concentrações 100 vezes maiores. Também não é observada nenhuma atividade combinando-se as D- e L-aldoses com o NADP.

TABELA II

ESPECIFICIDADE DA L-FUCOSE DESIDROGENASE FRENTE L-ALDOSES

L-aldose	Concentração (mM)	% de atividade
L-Fucose (contrôle)	10	100
L-Galactose	10	11
L-Galactose	40	32
L-Galactose	100	41
L-galactose + NADP (1 mM)	100	0
L-Glucose	5	0
L-Glucose	100	0
L-Manose	50	0
L-Manose	100	0
L-Xilose	5	0
L-Xilose	100	0
L-Rhamnose	100	0
L-Sorbose	100	0

O sistema de reação (1 ml) continha: 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 1 micromol de NAD, 9,7 microgramas de enzima e as quantidades indicadas de L-aldose. A reação foi iniciada com a adição do NAD, após 3 a 5 minutos de pré-incubação a 28°C.

EFEITO DE REAGENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA L-FUCOSE DESIDROGENASE:

Visando determinar os possíveis grupos envolvidos no sítio ativo da enzima, foram testados uma série de reagentes conhecidos como bloqueadores de grupos catalíticos essenciais à atividade enzimática de outras desidrogenases.

Como mostra a Tabela V, a atividade enzimática é totalmente inibida por mercuriais orgânicos em baixas concentrações (10^{-4} a 10^{-5} M) após pré-incubação com o reagente. A pré

TABELA III

ESPECIFICIDADE DA L-FUCOSE DESIDROGENASE
USANDO D-ALDOSES COMO SUBSTRATO*

D-aldose	Concentração (mM)	% de atividade
L-Fucose (contrôle)	10	100
D-Arabinose	10	0
D-Arabinose	50	0
D-Arabinose	100	0
D-Fucose	100	0
D-Galactose	100	0
D-Glucose	100	0
D-Ribose	100	0
D-Xilose	100	0
D-Lixose	100	0
2-Desoxi-D-Galactose	100	0
2-Desoxi-D-Glucose	100	0
2-Desoxi-D-Ribose	100	0

TABELA IV

EFEITO DA PRESENÇA DE L-GALACTOSE E D-ARABINOSE
SOBRE A ATIVIDADE DA L-FUCOSE DESIDROGENASE*

Aldose	Conc. (mM)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu\text{moles NADH}/\text{min} \cdot 10^3$)		
		S/L-FUCOSE	L-FUCOSE (5 mM)	L-FUCOSE (10mM)
Nenhum	-	-	26,3	32,1
L-Galactose	40	5,4	22,2	27,6
L-Galactose	100	7,8	16,3	21,6
D-Arabinose	10	0,0	26,3	32,0
D-Arabinose	100	0,0	26,2	32,0

* O sistema de reação usado foi o mesmo descrito na Tabela II, exceto para D-aldoses (Tabela III) e pela presença adicional de L-galactose e D-arabinose na concentração indicada na TABELA IV. A reação foi iniciada pela adição do NAD.

incubação da enzima com L-fucose protege em parte contra a inibição, o mesmo não acontecendo com relação ao NAD.

N-Etilmaleimida também exerce forte ação inibitória sobre a enzima, ocorrendo inibição total em concentrações de 10^{-4} M, irreversível mesmo por altas concentrações de ditioeritritol ou 2-mercaptoetanol.

A inibição pelos mercuriais orgânicos pode ser quase totalmente revertida por ditioeritritol, glutathion reduzido, 2-mercaptoetanol ou cisteína.

Reagentes oxidantes como o ácido o-iodoso-benzoi-co e os alquilantes halogenados como iodo-acetato e iodo-acetamida, na faixa de concentração de 10^{-3} M, apresentam ação inibitória pouco significativa. EDTA, em todas as concentrações ensaiadas não ocasionou alteração na atividade enzimática.

Ditioeritritol, 2-mercaptoetanol, glutathion reduzido e cisteína não aumentam a atividade da enzima.

O efeito de reagentes inorgânicos sôbre a atividade da enzima está resumido na Tabela VI.

Tetrationato de sódio foi ensaiado em concentrações relativamente altas ($7,5 \times 10^{-3}$ e 1×10^{-2} M) apresentando pequeno grau de inibição, quando comparado com os mercuriais orgânicos. Azida de sódio (1×10^{-2} M) não causa inibição sensível na atividade da L-fucose desidrogenase.

Cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de amônio e outros não apresentam qualquer efeito sobre a enzima. Cations divalentes como cobre, zinco, ferro, mercurio etc. provocam inibição em graus variáveis.

A inibição pelos cations divalentes com excessão do zinco e mercúrio pode ser parcialmente revertida pelo EDTA.

TABELA V

EFEITO DE REAGENTES ORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE
DA L-FUCOSE DESIDROGENASE

Reagente	Concentração(M)	Inibição(%)
Contrôle (s/ inibidor)	-	0
N-Etilmaleimida(*)	$5,0 \times 10^{-3}$	100
N-Etilmaleimida(*)	$1,0 \times 10^{-4}$	100
N-Etilmaleimida(*)	$5,0 \times 10^{-5}$	84
N-Etilmaleimida(**)	$5,0 \times 10^{-3}$	75
N-Etilmaleimida(**)	$5,0 \times 10^{-5}$	43
p-Cloromercuribenzoato(*)	$1,25 \times 10^{-3}$	100
p-Cloromercuribenzoato(*)	$1,0 \times 10^{-4}$	100
p-Cloromercuribenzoato(*)	$1,25 \times 10^{-5}$	100
p-Cloromercuribenzoato(**)	$1,25 \times 10^{-3}$	95
p-Cloromercuribenzoato(**)	$1,25 \times 10^{-5}$	33
p-Hidroximercuribenzoato(*)	$1,25 \times 10^{-3}$	100
p-Hidroximercuribenzoato(**)	$1,00 \times 10^{-5}$	26
p-Cloromercuribenzoato(*) + Ditioeritritol 5×10^{-3} M(***)	$1,00 \times 10^{-5}$	0
p-Cloromercurifenilsulfonato(*)	$1,25 \times 10^{-3}$	100
p-Cloromercurifenilsulfonato(*)	$1,25 \times 10^{-5}$	100
p-Cloromercurifenilsulfonato(**)	$1,25 \times 10^{-5}$	42
Iodoacetamida(*)	$1,0 \times 10^{-3}$	9
Iodoacetamida(*)	$1,0 \times 10^{-2}$	21
Ácido o-iodosobenzoico(*)	$1,25 \times 10^{-3}$	9
Ácido o-iodosobenzoico(*)	$1,0 \times 10^{-2}$	15
EDTA(*)	$1,0 \times 10^{-2}$	0
EDTA(*)	$5,0 \times 10^{-2}$	0

(*) A enzima foi previamente incubada a 28°C, por 3 minutos, com o reagente. A reação foi iniciada por adição da L-fucose.

(**) A enzima foi pré-incubada com L-fucose, sendo o inibidor adicionado após o período de incubação. A reação foi iniciada pela adição do NAD.

(***) O reagente foi adicionado após a reação com o inibidor. O sistema de incubação (1 ml) continha: 20 micromoles de TRIS-HCl pH 8,5, 1 micromol de NAD, 10 micromoles de L-fucose 9,7 microgramas de enzima e as quantidades de cada reagente.

TABELA VI

EFEITO DE REAGENTES INORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE
DA L-FUCOSE DESIDROGENASE

Reagente	Concentração(M)	% de Atividade
Contrôle	-	100
ZnCl ₂	1,0 x 10 ⁻³	40
ZnCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	0
CuCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	45
CuCl ₂	1,0 x 10 ⁻³	67
CaCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	100
NH ₄ Cl	5,0 x 10 ⁻³	100
KCl	1,0 x 10 ⁻²	100
NaCl	1,0 x 10 ⁻²	100
MnCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	100
NaF	5,0 x 10 ⁻³	100
FeCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	40
FeCl ₂	5,0 x 10 ⁻²	27
HgCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	0
MgCl ₂	5,0 x 10 ⁻³	100
Azida de sódio	5,0 x 10 ⁻³	92
Arsenito de sódio	5,0 x 10 ⁻³	100
Tetrationato de sódio	5,0 x 10 ⁻³	63
Tetrationato de sódio	1,0 x 10 ⁻²	66

Sistema de reação (1 ml): 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 10 micromoles de L-fucose, 1 micromol de NAD, 20 microgr_amas de enzima e as quantidades indicadas de cada reagente. A enzima foi previamente incubada com o reagente a 28°C durante 3 minutos em presença de NAD, sendo a reação iniciada pela adição da L-fucose.

PROPRIEDADES CINÉTICAS:

a) Efeito da concentração de L-fucose e de NAD:

A enzima apresenta comportamento cinético segundo Michaelis-Menten com relação à variação da concentração de L-fucose e do cofator NAD.

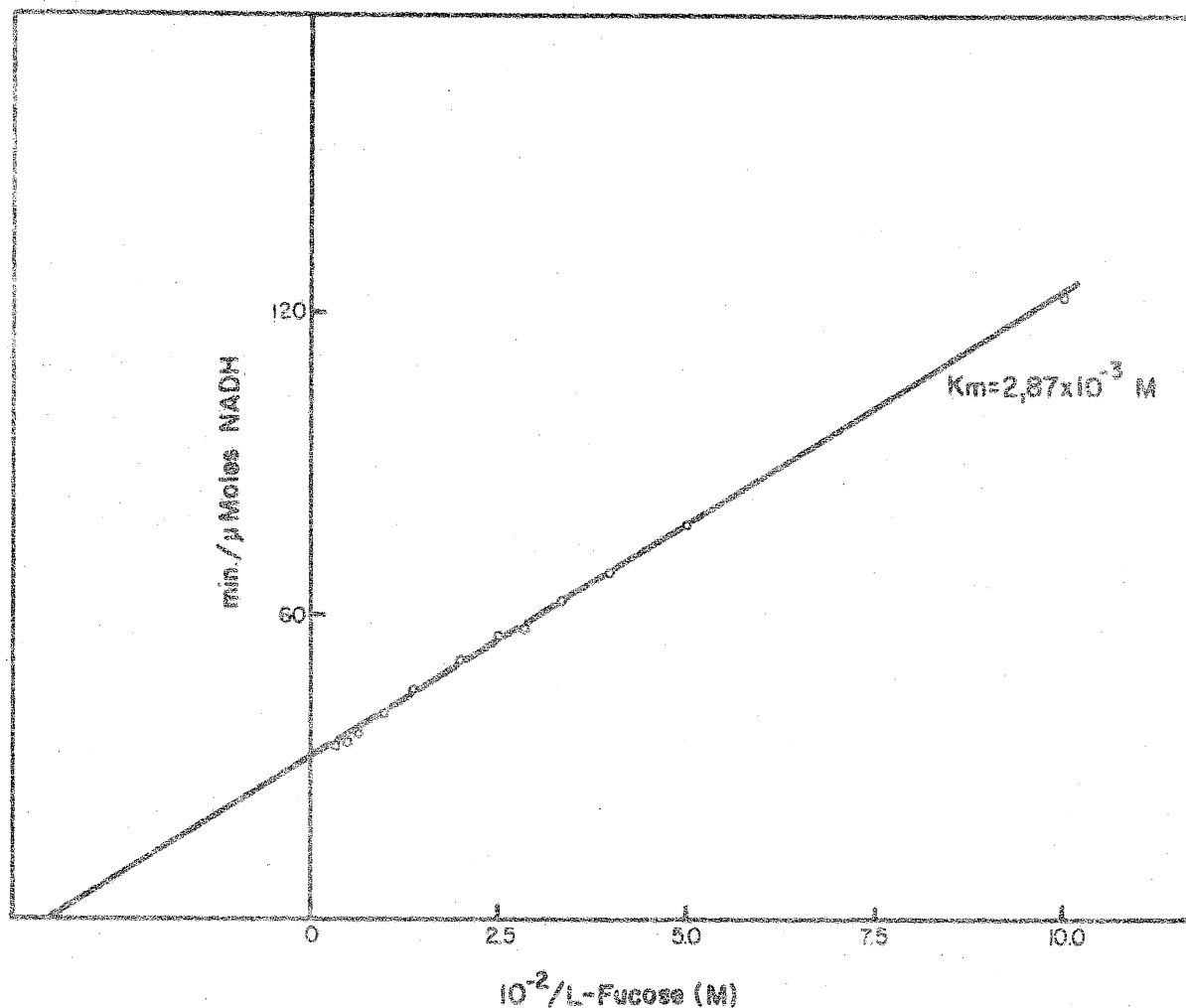
O efeito da concentração de L-fucose, em concentração saturante de NAD (2 mM) é mostrado na Figura 8. O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m), calculado segundo o método gráfico de LINEWEAVER-BURK (63), é igual a $2,87 \times 10^{-3}M$, em pH 8,5. A velocidade máxima, determinada também graficamente a partir da figura 8, é igual a 1,485 micromoles de NADH formado por minuto e por miligrama de enzima.

A variação da velocidade da reação relativamente à concentração de NAD, em presença de concentração saturante de L-fucose, é mostrada na Figura 9 e o valor das constantes K_m e V_{max} (velocidade máxima), determinado graficamente na mesma figura, são iguais a $1,03 \times 10^{-4}M$ e 1,250 micromoles de NADH formado por minuto e por miligrama de enzima, respectivamente.

O efeito do pH sobre as constantes K_m e V_{max} pode ser visto nos diagramas apresentados nas Figuras 10 e 11, respectivamente para L-fucose e NAD. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados em pH 7,0, 8,5 e 9,5, o que revelou sensíveis alterações em ambas as constantes. Tanto para a L-fucose como para o NAD, as velocidades máximas decrescem sensivelmente com o abaixamento do pH. A velocidade máxima para L-fucose em pH 7,0 é em torno de 30% da obtida em pH 9,5. Quando a concentração de NAD é variada em relação à L-fucose, a velocidade máxima em pH 7,0 é menor que 20% da obtida nas mesmas condições em pH 9,5.

Figura 8

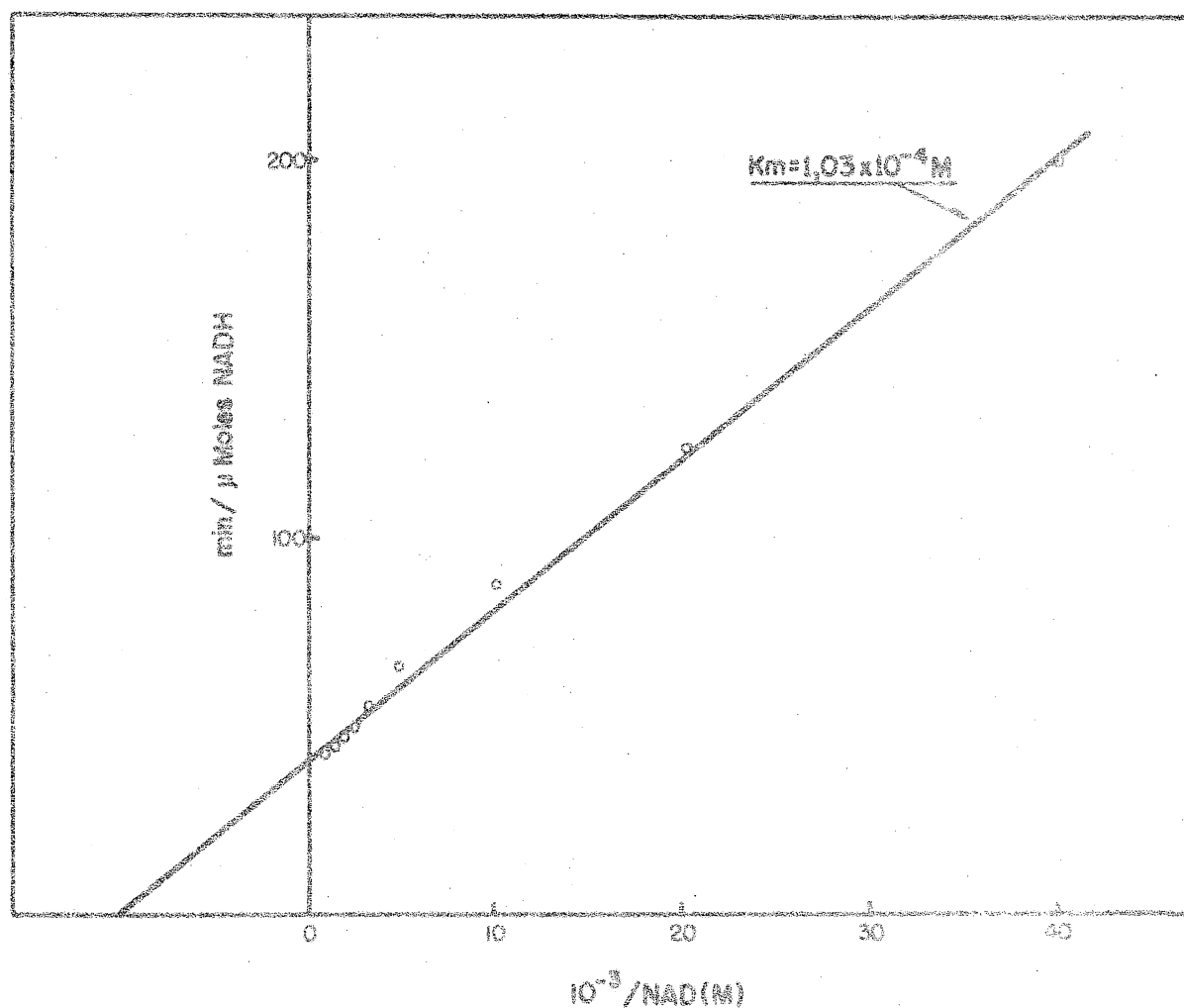
Efeito da Concentração de L-Fucose
Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m)



Sistema de incubação : 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 2 micromoles de NAD, 20 microgramas de enzima e as quantidades / indicadas de L-fucose num volume final de 1ml. A redução do NAD foi seguida continuamente a 340 milimicra em espectrofotometro / "Beckman" modelo DU-2 com registrador acoplado, a temperatura da câmara do aparelho (28° C). A reação foi iniciada com a adição da enzima.

Figura 9

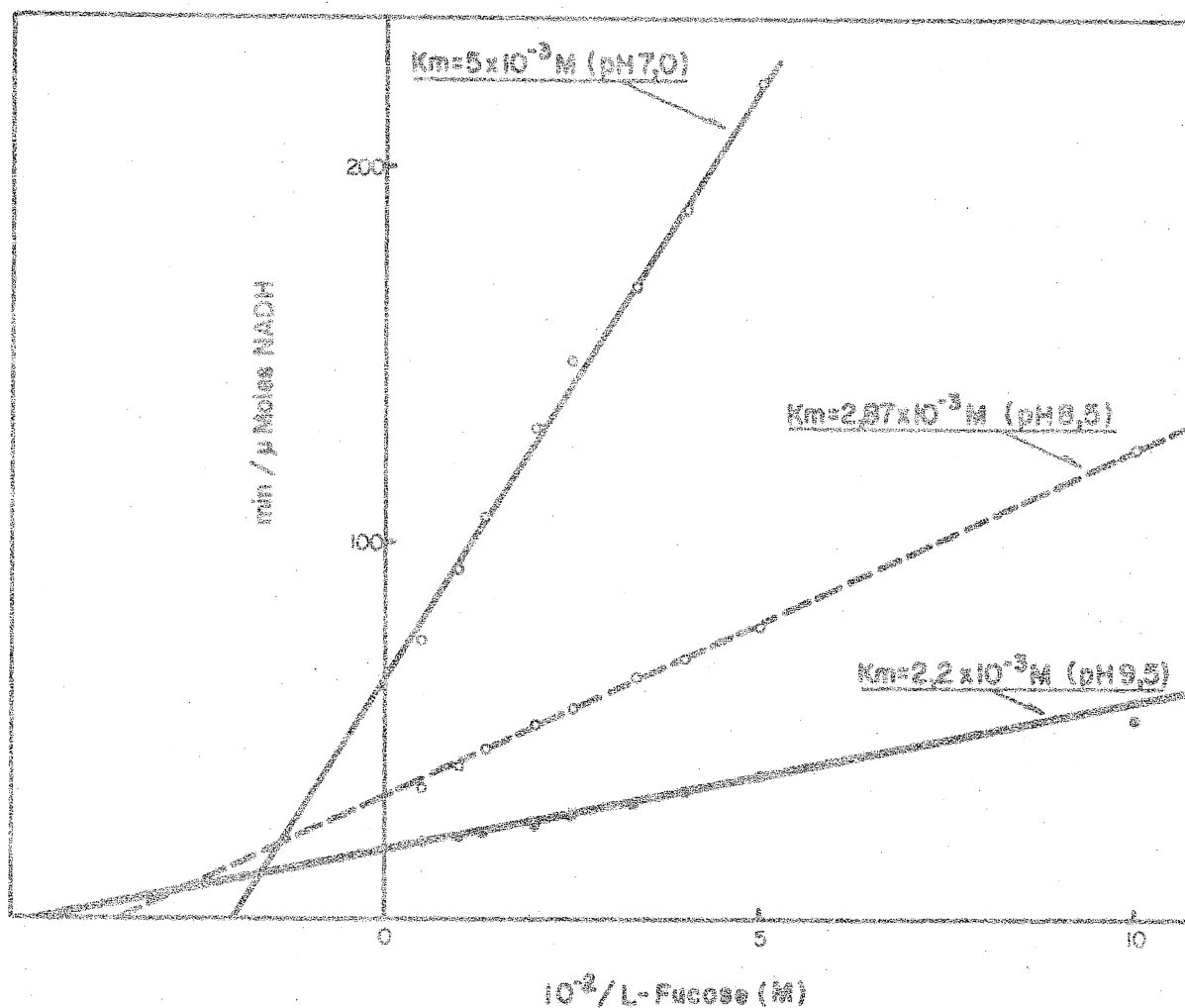
Efeito da Concentração de NAD
Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m)



Sistema de Incubação: 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 30 micromoles de L-fucose, 20 microgramas de enzima, e as quantidades indicadas de NAD, num volume final de 1 ml. A experiência foi efetuada nas mesmas condições descritas na figura anterior.

Figura 10

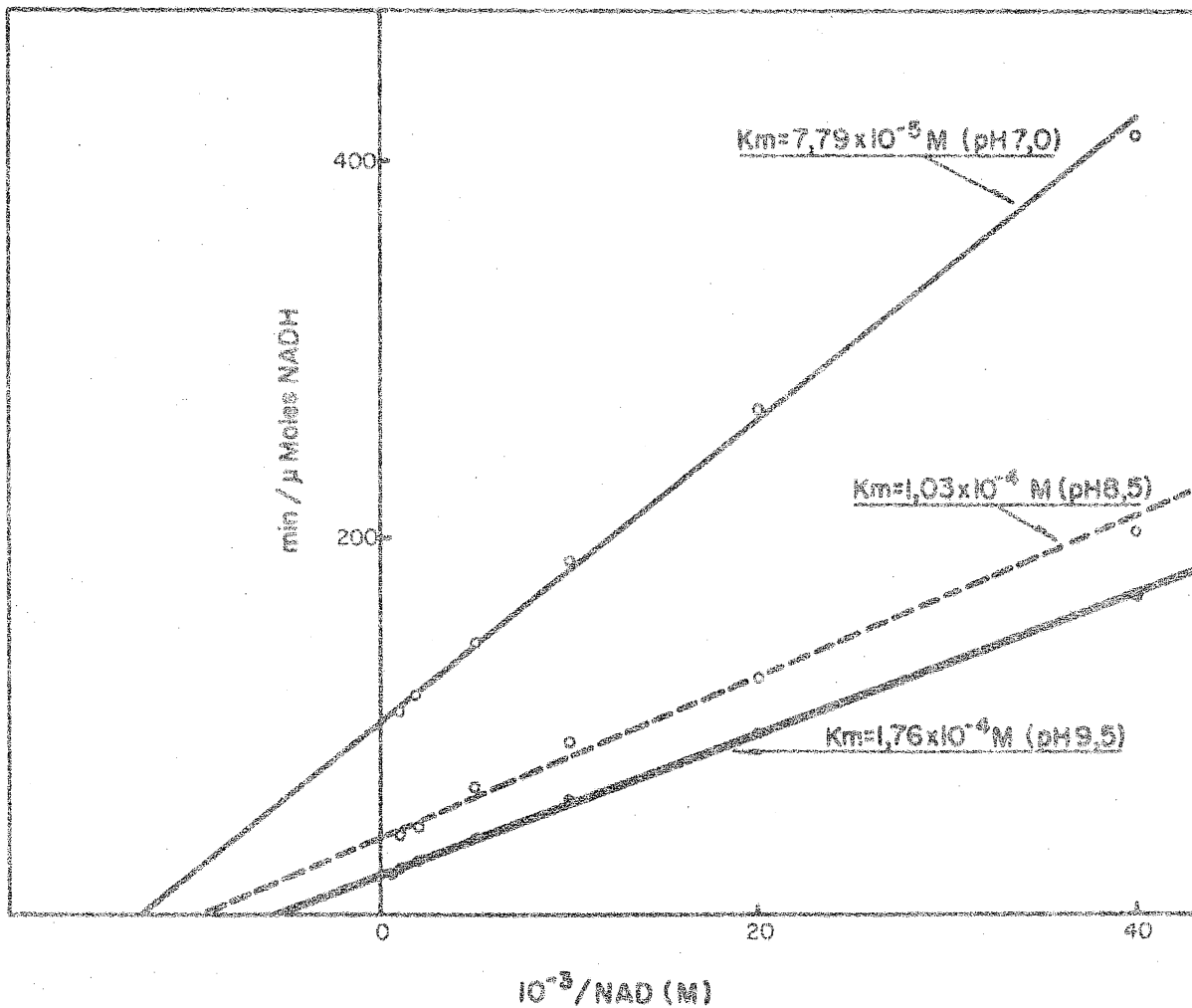
Efeito do pH sobre as Constantes K_m e V_{max} .



O sistema de reação (1 ml) continha: 2 micromoles de NAD, 20 microgramas de enzima, quantidades indicadas de L-fucose e 20 micromoles de tampão no pH indicado (pH 7,0 - tampão fosfato, pH 8,5 - tampão TRIS-HCl, e pH 9,5 - tampão glicina-NaOH). As determinações foram efetuadas do mesmo modo descrito na Figura 8.

Figura 11

Efeito do pH sobre as Constantes K_m e V_{max}



O sistema de incubação, 1ml, continha 20 micromoles de L-fucose, 20 microgramas de enzima, quantidades indicadas de NAD e 20 micromoles de tampão no pH indicado (pH 7,0 - tampão fosfato, pH 8,5 - tampão TRIS-HCl e pH 9,5 - tampão glicina-NaOH). As condições foram as mesmas descritas na Figura 6.

Por outro lado, o efeito do pH sobre as constantes de Michaelis-Menten, com relação aos dois substratos, são contrários. A L-fucose desidrogenase apresenta maior afinidade por L-fucose à medida que o pH aumenta. O inverso é observado com relação ao cofator NAD: a afinidade da enzima pelo NAD é maior em pH 7,0 do que em pH 9,5.

b) Efeitos de inibição:

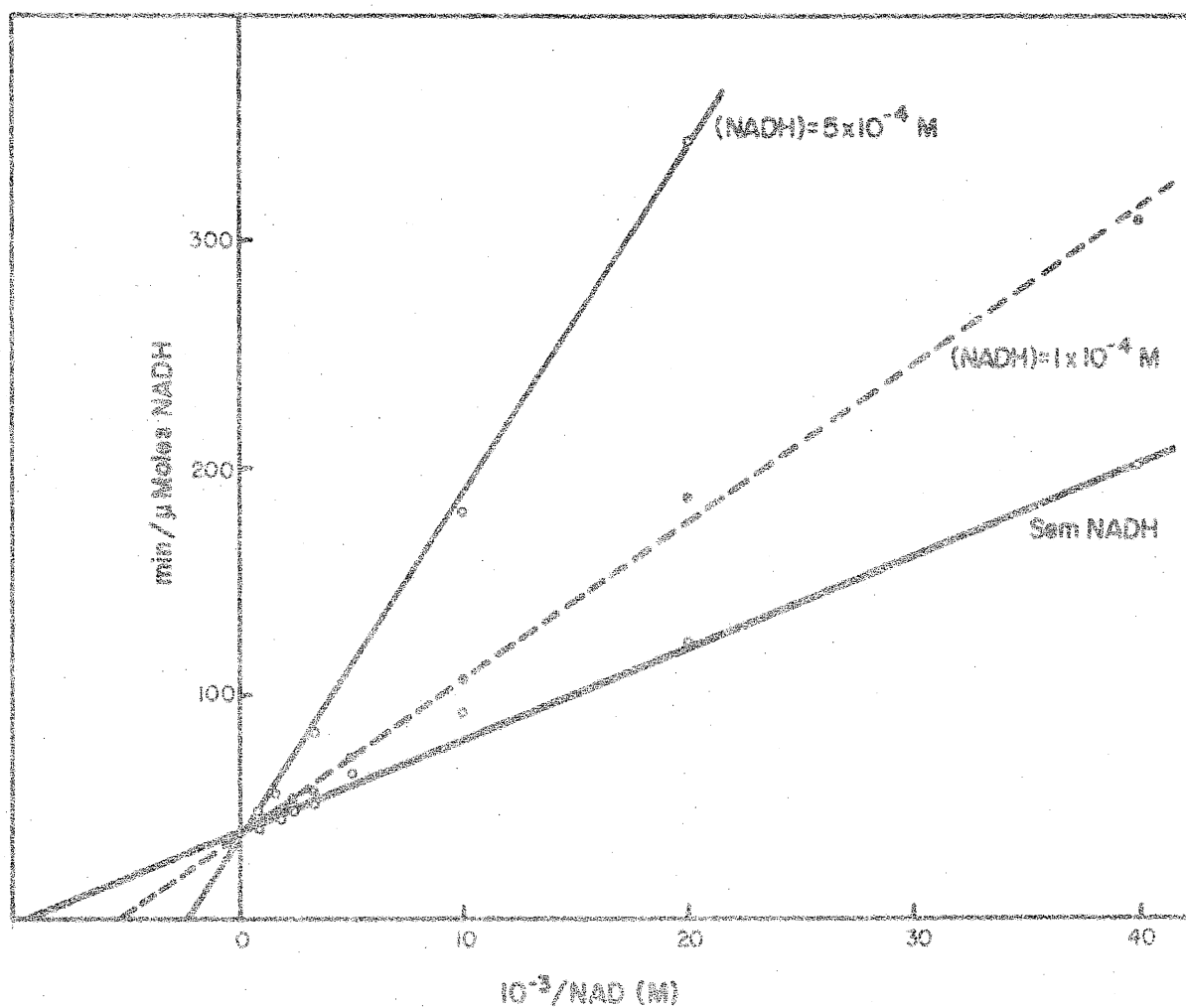
O NADH formado como produto da reação exerce efeito inibitório sobre a atividade da L-fucose desidrogenase. Nenhum fenômeno de inibição foi observado quando se usou o ácido L-fucônico e a gama-L-fuconolactona, mesmo em concentrações relativamente elevadas. Também não foi verificada nenhuma inibição com NADP nas concentrações de $5,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ M.

O efeito inibitório do NADH com relação ao NAD, e em presença de concentração saturante de L-fucose, é mostrado na Figura 12. A inibição é claramente do tipo competitivo sendo determinado o valor da constante de inibição igual a $1,22 \times 10^{-4}$ M (A constante de inibição foi determinada pela intersecção com o eixo das abcissas).

Quando a ação inibitória do NADH foi ensaiada com relação à L-fucose (Figura 13), em presença de concentração de NAD próxima à saturante, a inibição da atividade da enzima mostrou-se do tipo não competitivo. A inibição desaparece à medida que se eleva a concentração do NAD até a saturação. Efeito diferente é o que se observa com a inibição causada pelo NADH com relação ao NAD, isto é, a inibição permanece do tipo competitivo e independente de ser a concentração de L-fucose saturante ou subsaturante.

Figura 12

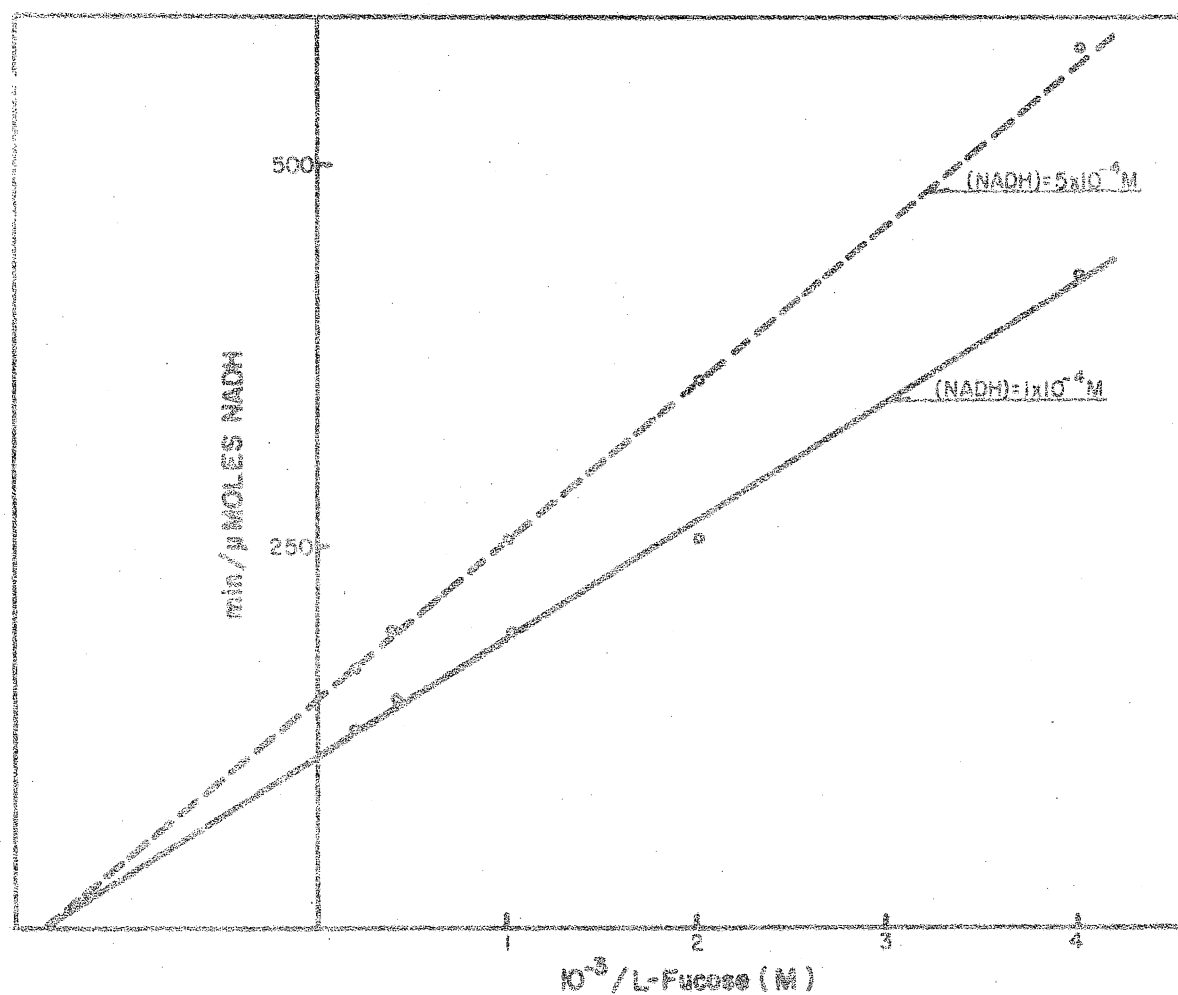
Efeito Inibitório do Produto NADH



O sistema de reação (1 ml) continha 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 30 micromoles de L-fucose, 20 microgramas de enzima e as quantidades indicadas de NAD e NADH. As condições / usadas foram as mesmas descritas na Figura 8.

Figura 13

Efeito Inibitório do Produto NADH



O sistema de reação continha 20 micromoles de tampão TRIS-HCl pH 8,5, 0,5 micromoles de NAD, 4,5 microgramas de enzima e as quantidades indicadas de L-fucose e NADH, num volume final de 1 ml. A experiência foi efetuada nas mesmas condições descritas na Figura 8.

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO:

O produto de oxidação da L-fucose pela L-fucose desidrogenase, em pH 9,0, foi inicialmente identificado por eletroforese em papel como um composto que apresentava a mesma migração eletroforética que o ácido L-fucônico.

A partir de misturas de incubação normalmente usadas, era pequena a quantidade do produto obtido, possivelmente devido à inibição causada pelo NADH formado. No entanto, foi determinado que maiores quantidades do produto eram formados, acoplando-se um sistema para a regeneração do NAD. Para isto, foi usado o sistema peroxidase-resorcinol (61).

Por cromatografia em papel, o composto isolado da mistura de incubação apresentou o mesmo comportamento que a L-fucono-gama-lactona, e após alcalinização, apresentou a mesma mobilidade que a do ácido L-fucônico (sal de sódio) usado como padrão. Estes resultados estão mostrados na Figura 14.

O derivado benzimidazólico (15 mg) obtido com o produto, preparado segundo HEATH & ROSEMAN (49), apresentou ponto de fusão igual a 256°C.

Estudos em outras aldoses desidrogenases indicam ser o produto imediato da oxidação de aldoses, a aldonolactona correspondente, que se hidroliza espontaneamente ao ácido em pHs alcalinos (64 - 66).

O possível envolvimento da L-fuconolactona intermediária na reação de oxidação da L-fucose foi testada com a presença de hidroxilamina no meio de incubação, da mesma maneira descrita por ROSEMAN et alii (31). A tabela VII mostra que a quantidade de hidroxamato é dependente do pH e da quantidade de hidroxilamina presente na mistura de reação.

TABELA VII

FORMAÇÃO DE HIDROXYAMATO DURANTE A OXIDAÇÃO DA L-FUCOSE

pH da mistu- ra de reação	Hidroxil amina(M)	NADH μ Moles/ml	Ac. fucônico μ Moles/ml	Hidroxamato μ Moles/ml
8,5	0	0,62	0,58	0
8,5	0,1	0,61	0,63	0
8,5	0,3	0,67	0,55	0 (*)
7,0	0	0,47	0,50	0 (*)
7,0	0,1	0,48	0 (*)	0,36
7,0	0,3	0,51	0 (*)	0,45

(*) Quantidade insignificante.

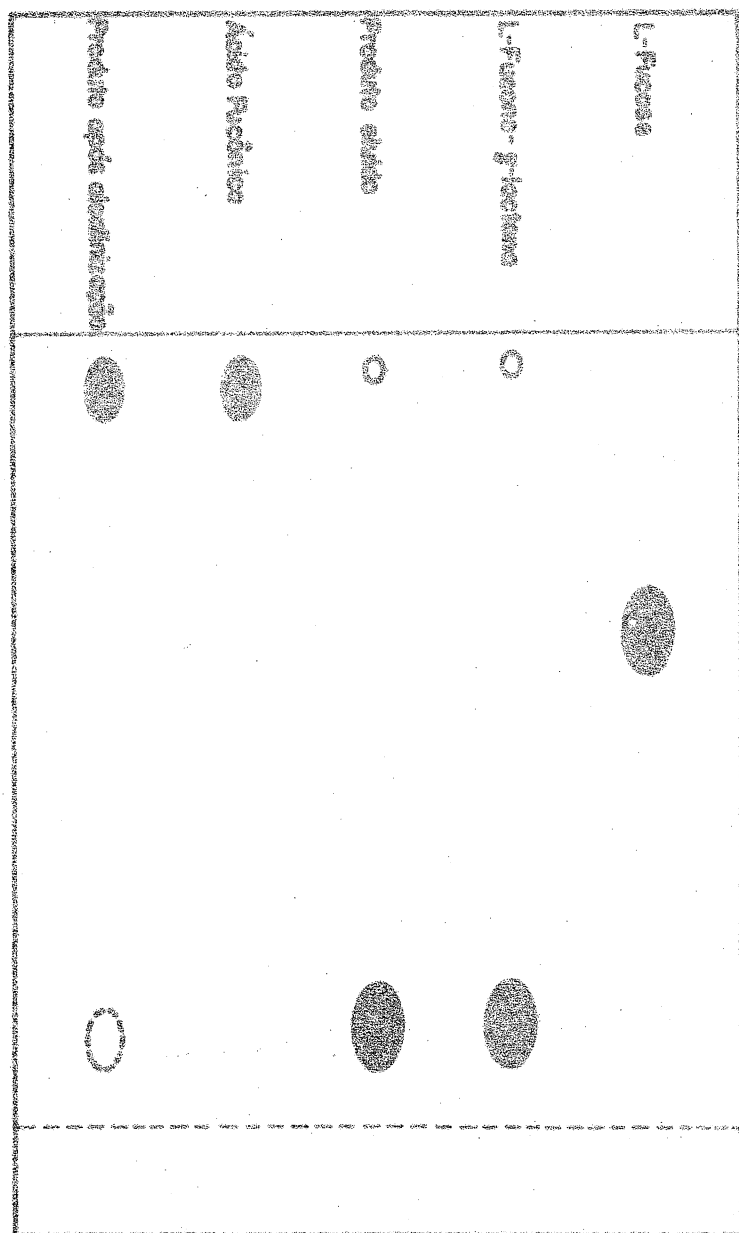
Cada sistema de incubação (5 ml) continha: 100 micromoles de L-fucose, 10 micromoles de NAD, 100 micromoles de TRIS-HCl pH 8,5 ou HEPES pH 7,0, 100 microgramas de enzima e as quantidades indicadas de hidroxilamina. A mistura foi incubada durante 2 horas em temperatura ambiente. Na determinação do hidroxamato, segundo LIPMANN & TUTTLE (67), 0,2 ml do reagente hidroxilamina foi adicionado logo após a incubação e mantido por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Alíquotas de 0,5 ml foram ensaiadas em duplicata. Gama-L-galactonolactona foi usada como padrão.

ESTEQUIOMETRIA E REVERSIBILIDADE:

A Tabela VII mostra que para cada mol de NADH formado, um mol de L-fucose é oxidada a ácido L-fucônico.

Não foi possível a demonstração da reversibilidade da reação tanto usando o ácido L-fucônico quanto a gama-L-fuconolactona.

Diagrama de cromatografia em papel cromatográfico o Whotman
 nº 1, do produto de oxidação da L-fucose, conforme descrito em
 Materiais e Métodos, usando, como solvente o misto 1-But-
 nol: piridina: água (6:4:3).



Cromatografia do Produto de Resíduo

D I S C U S S Ã O

O presente trabalho relata a purificação e caracterização de uma desidrogenase para L-fucose, isolada de Pullularia pullulans, crescida em meio mineral contendo L-fucose como única fonte de carbono.

Desidrogenases para este desoxiaçucar ainda não foram descritas em microrganismos e fungos. Apenas uma D-aldo se desidrogenase inespecífica, descrita por CLINE & HU (35-38) em um mutante de Pseudomonas saccharophila, também oxida L-fucose. Esta enzima, porém, difere da desidrogenase aqui descrita no que se refere à especificidade pelos substratos e pela inespecificidade com relação ao cofator: seu melhor substrato é a D-arabinose, podendo utilizar tanto o NAD quanto o NADP como aceitador de eletrons.

A existência de desidrogenases semelhantes para a L-fucose foi recentemente descrita em tecidos animais, mais precisamente em fígado de porco, por ROSEMAN et alii, 1969 (31) e em fígado de carneiro, por MOBLEY et alii, 1970 (32). O substrato preferido desta última também é a D-arabinose.

A presença de atividade de L-fucose desidrogenase também foi encontrada em outros tecidos animais, em diferentes espécies.

As características gerais da L-fucose desidrogenase de Pullularia pullulans são bastante semelhantes às descritas em tecidos animais.

O produto da reação foi caracterizado como sendo o ácido L-fucônico, em toda a faixa de pH de atividade da enzima. O fato de não ter sido detectada a presença da lactona in

intermediária em pH 7,0, sugere a exclusão da gama-L-fuconolactona como o produto imediato da reação, uma vez que este isômero é estável em pH 7,0.

Os resultados expressos na Tabela VII e a irreversibilidade da reação com a gama-L-fuconolactona e com o ácido L-fucônico, indicam que esta enzima, do mesmo modo que a L-fucose desidrogenase descrita por ROSEMAN et alii (31), oxida a L-fucose ao ácido L-fucônico, através do isômero instável delta-L-fuconolactona que se hidrolisa espontaneamente logo após a sua formação.

A L-fucose desidrogenase apresentou alta especificidade com relação aos substratos. Dentre todas as D- e L-aldoses, apenas a L-galactose, além da L-fucose, serviu como substrato. A enzima não apresenta nenhuma atividade com a D-arabinose, que é a pentose correspondente mais estruturalmente relacionada com a L-fucose e L-galactose.

Estes resultados diferem sensivelmente da especificidade apresentada pelas L-fucose desidrogenases extraídas de tecidos animais (31, 32), que são bastante ativas com respeito à D-arabinose e outras aldoses.

Considerando-se a relação estrutural entre estes açúcares (D-arabinose, L-fucose e L-galactose), o carbono 6, equatorialmente orientado, parece ser necessário à atividade catalítica da enzima, e a substituição de um hidrogênio do grupo metila da L-fucose (C_6) por um grupo hidroxila (L-galactose) resulta no decréscimo de 60% da atividade comparada com a obtida com a L-fucose.

Da mesma forma, comparando-se as relações estruturais da L-fucose e L-galactose com os outros açúcares testados,

que também apresentam o carbono 6 equatorialmente orientado, como L-rhamnose, L-manose e L-glucose, mas que diferem em um ou mais pontos entre C₂ a C₄, pode-se supor que não só o C₆ equatorial é o determinante estereoespecífico da enzima, mas, também, no mínimo, a hidroxila axial no carbono 4.

Os resultados apresentados nas Tabelas V e VI sugerem o envolvimento de grupamentos tióis de resíduos cisteína essenciais à atividade catalítica da L-fucose desidrogenase. Neste aspecto, a L-fucose desidrogenase de Pullularia pullulans difere sensivelmente da estudada por ROSEMAN et alii (31), uma vez que esta última é pouco sensível aos reagentes inibidores de grupamentos tióis.

A competição observada entre a L-fucose e o inibidor, quando a enzima foi previamente incubada com a L-fucose, sugere que estes grupos estejam relacionados com a interação da enzima com a L-fucose.

O efeito de proteção pelo substrato contra a inibição por reagentes bloqueadores de grupos tióis é conhecido em algumas enzimas (69 - 71). A importância de grupamentos tióis livres na interação do gliceraldeído-3-fosfato com a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho, foi estabelecida por HOLZER & HOLZER (69) e por BOYER & SEGAL (72), através da demonstração de que o gliceraldeído-3-fosfato protegia especificamente a atividade da enzima contra a inibição por iodoacetato. BOYER & SEGAL (72) mostraram a formação de um complexo acil-enzima entre a enzima e o gliceraldeído-3-fosfato, envolvendo a participação de grupamento tiol como acceptor.

Embora existam evidências de que na maioria das desidrogenases simples a interação do NAD e NADH com a enzima tam

bém se faz com o envolvimento de grupamentos tióis (73 - 76), não foi observada a proteção contra a inibição quando a enzima foi pré-incubada com o NAD.

A velocidade máxima da L-fucose desidrogenase é fortemente dependente do pH. Embora tenha sido observado variação no valor das constantes K_m tanto para o NAD como para a L-fucose, estas variações são insuficientes para explicar o comportamento da enzima frente ao pH, tendo-se em conta que as medidas de atividade foram feitas em concentração saturante de NAD e L-fucose, eliminando, desta forma, os efeitos de variação da afinidade. Outros fatores devem estar envolvidos, como variação de conformação ou uma possível ativação por ânions. De fato, como pode ser visto na Figura 7, sensível diferença na atividade foi observada entre o tampão glicina e carbonato.

O efeito inibitório do NADH formado como produto da reação foi estudado com relação à L-fucose e ao NAD. A inibição do NADH com relação à L-fucose é do tipo não competitivo e reversível quando se aumenta a concentração do NAD até a saturação. Estes resultados parecem indicar que a interação do NADH com a enzima não está diretamente relacionada com a interação da L-fucose. A inibição, neste caso, deve ser apenas o resultado da competição com o NAD. De fato, a inibição é competitiva com relação ao NAD. O valor da constante de inibição igual a $1,22 \times 10^{-4} M$, indica que a enzima apresenta aproximadamente a mesma afinidade para o NAD e NADH. Neste aspecto, a L-fucose desidrogenase parece diferir da maioria das desidrogenases simples, as quais apresentam, em geral, uma afinidade pelo NADH bem maior do que pelo NAD, com exceção da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, em que o NAD é fortemente ligado, mesmo em preparações cristalinas. (77).

Estes dados cinéticos de inibição pelo NADH, quando analisados segundo as formulações de CLELAND (78,79) e WALTER & FRIEDEN (80) mostram um quadro de inibição consistente com o mecanismo proposto por THEORELL & CHANCE (81) para a álcool desidrogenase, o qual é aceito para a maioria das desidrogenases simples. Entretanto, um mecanismo "Ordered Bi-Bi" não pode ser totalmente excluído, uma vez que não foi possível verificar o efeito inibitório do outro produto da reação, a L-fucoono-delta-lactona.

A presença da L-fucose desidrogenase em Pullularia pullulans sugere que este microrganismo é capaz de utilizar L-fucose através de um mecanismo diferente do descrito em Escherichia coli (25 - 28).

A L-fucose desidrogenase deve ser a enzima que inicia uma via oxidativa de degradação, semelhante à descrita por DAHMS & ANDERSON para a degradação da D-fucose em bactéria da família das Pseudomonadales. (39 - 42).

CONCLUSÕES

1. Pullularia pullulans, adaptada à utilização de L-fucose como única fonte de carbono, apresenta uma desidrogenase NAD-dependente específica para L-fucose e L-galactose.
2. A enzima é altamente específica por NAD como cofator.
3. A atividade da L-fucose desidrogenase é dependente de grupos tióis livres. L-fucose protege especificamente a enzima contra a inibição por reagentes bloqueadores de grupos tióis.
4. NADH inibe a reação competitivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KOBATA, A. J. Biochem., 53: 167, 1963.
2. STACEY, M. & BARKER, S. A. Carbohydrates of Living Tissues, Van Nostrand, London, 1962, p. 122.
3. WATKINS, W. M. In: GOTTSCHALK, A. (ed.) Glycoproteins , Their Composition, Structure and Function, vol. 5, Amsterdam, Elsevier Publishing Co., 1966, p. 462.
4. WINZLER, R. J. In: BALAZS, E. A. & JEANLOZ, R. W. (eds.) The amino Sugars, vol. IIA, New York, Academic Press, 1968, p. 337.
5. DUDMAN, W. F. & WILKINSON, J. F. Biochem. J., 62:289, 1956
6. HAKAMORI, S. & JEANLOZ, R. W. J. Biol. Chem., 239:PC3606, 1964.
7. McMILLAN, D. E. In: MOBLEY, P. W.; METZGER, R. P. & WICK, A. N. Arch. Biochem. Biophys., 139: 83, 1970.
8. FEDYANIN, Y.; RABINOVICH, P. D. & VAISTUKH, S.I. In: Biol. Abstracts, 55(7): 3931, 1973, nº 38438.
9. HEATH, E. C. & ROSEMAN, S. J. Biol. Chem., 230:511, 1958.
10. SEGAL, S. & TOPPER, Y. J. Biochim. Biophys. Acta, 25: 419, 1957.
11. WILKINSON, J. F. Nature, 180: 995, 1957.
12. SEGAL, S. & TOPPER, Y. J. Biochim. Biophys. Acta, 42:147, 1960.
13. GINSBURG, V. J. Biol. Chem., 236: 2389, 1961.
14. DENAMUR, R.; FAUCONNEAU, G. & JARRIGE-GUNTZ, G. In: FOSTER, D. W. & GINSBURG, V. Biochim. Biophys. Acta, 54: 376, 1961

15. DENAMUR, R.; FAUCONNEAU, G. JARRIGE-GUNTZ, G. In: FOSTER, D. W. & GINSBURG, V. Biochim. Biophys. Acta, 54: 376, 1961.
16. CARLSON, D. M. & HANSEN, R. G. Fed. Proc., 20: 84, 1961.
17. ISHIHARA, H. S. & HEATH, E. C. J. Biol. Chem., 243: 1110, 1968.
18. FOSTER, D. W. & GINSBURG, V. Biochim. Biophys. Acta, 54: 376, 1961.
19. GROLLMANN, A. P.; HALL, C. W. & GINSBURG, V. J. Biol. Chem., 240: 975, 1965.
20. COFFEY, J. W.; MILLER, O. N. & SELLING, O. Z. J. Biol. Chem., 239: 4011, 1964.
21. GROLLMAN, A. P. & MARCUS, D. M. Biochem. Biophys. Res. Comm., 25: 542, 1966.
22. SHEN, L.; GROLLMAN, E. F. & GINSBURG, V. Proc. Natl. Acad. Sci., 59: 224, 1968.
23. BEKESI, J. G. & WINZLER, R. J. J. Biol. Chem., 242: 3873, 1967.
24. EAGON, R. G. J. Bacteriol., 82: 548, 1961.
25. GREEN, M. & COHEN, S. S. J. Biol. Chem., 219: 557, 1956.
26. HUANG, P. G. & MILLER, O. N. J. Biol. Chem., 231: 201, 1958.
27. HEATH, E. C. & GHALAMBOR, M. A. J. Biol. Chem., 237: 2423, 1962.
28. HEATH, E. C. & GHALAMBOR, M. A. J. Biol. Chem., 237: 2427, 1962.
29. WILSON, D. M. & AJL, S. J. Bacteriol., 73: 410, 1957.
30. WILSON, D. M. & AJL, S. J. Bacteriol., 73: 415, 1957.
31. CHACHTER, H.; SARNEY, J.; McGUIRE, E. J. & ROSEMAN, S. J. Biol. Chem., 244: 4785, 1969.

32. MOBLEY, P. W.; METZGER, R. P. & WICK, A. N. Arch. Biochem. Biophys., 139: 83, 1970.
33. AXELROD, B. In: GREENBERG, D. M. (ed.) Metabolic Pathways, Vol. I, New York, Academic Press, 1960, p. 223.
34. MOBLEY, P. W.; METZGER, R. P. & WICK, A. N. In: Biol. Abstracts, 55(9): 4958, 1973, nº 48536.
35. HU, A. S. & CLINE, A. L. Biochim. Biophys. Acta, 93:237, 1964.
36. CLINE, A. L. & HU, A. S. L. J. Biol. Chem., 240:4488, 1965.
37. CLINE, A. L. & HU, A. S. L. J. Biol. Chem., 240:4493, 1965.
38. CLINE, A. L. & HU, A. S. L. J. Biol. Chem., 240:4498, 1965.
39. DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. J. Biol. Chem., 247: 2222, 1972.
40. DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. J. Biol. Chem., 247: 2228, 1972.
41. DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. J. Biol. Chem., 247: 2233, 1972.
42. DAHMS, A. S. & ANDERSON, R. L. J. Biol. Chem., 247: 2238, 1972.
43. VEIGA, L. A. & NAKANO, M. Dados não publicados.
44. LIU, T. & INGLIS, A. S. In: HIRS, C. H. W. & TIMASHEFF, E. (eds.) Methods in Enzimology, vol. 25, New York, Academic Press, 1972, p. 57.
45. WOLFROM, M. L. & ANNO, K. J. Am. Chem. Soc., 74:5583, 1952.
46. FRUSH, H. L. & ISBELL, H. S. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM M. L. (eds.) Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. I, Analyses and Preparation of Sugars, New York, Academic Press, 1962, p. 127.
47. MOORE, S. & LINK, J. P. J. Biol. Chem., 133: 293, 1940.

48. CLARK, E. P. J. Biol. Chem., 54: 65, 1922.
49. HEATH, E. C. & ROSEMAN, S. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M. L. (eds.) Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. II, Reactions of Carbohydrates, New York, Academic Press, 1962, p. 138.
50. NAKANO, M. & VEIGA, L. A. Dados não publicados.
51. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Biochem. Z., 310: 384, 1941.
52. LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
53. HESTRIN, S. J. Biol. Chem., 180: 249, 1949.
54. HOUGH, L. & JONES, J. K. N. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M. L. (eds.) Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. I, Analyses and Preparation of Sugars, New York, Academic Press, 1962, p. 21.
55. TREVELYAN, E. W.; PROCTER, D. P. & HARRISON, J. S. Nature, 166: 444, 1950.
56. VEIGA, L. A. & CHANDELIER, E. L. Anal. Biochem., 20: 419, 1967.
57. ABDEL-AKHER, M. & SMITH, F. J. J. Am. Chem. Soc., 73: 5859, 1951.
58. DAVIS, J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 404, 1964.
59. INSTRUCTION Manual 4200 Electrophoresis System, Oak Ridge, Tenn., Ortec, 1970.
60. GABRIEL, O. In: JACOBY, W. B. (ed.) Methods in Enzymology, vol. 22, New York, Academic Press, 1971, p. 578.
61. AKAZAWA, T. & CONN, E. E. J. Biol. Chem., 232: 403, 1958.
62. SOBER, H. A.; GUTTER, J. F.; WICKOFF, M. & PETERSON, E. A. J. Am. Chem. Soc., 78: 756, 1965.
63. LINEWEAVER, H. & BURK, D. J. Am. Chem. Soc., 56: 658, 1934.

64. STRECKER, H. J. & KORKES, S. J. Biol. Chem., 196:769, 1952.
65. WALLENFELS, K. & KURZ, G. Biochem. Z., 335: 559, 1962.
66. AVIGAD, G.; ALROY, Y. & ENGLARD, S. J. Biol. Chem., 243:
1936, 1968.
67. LIPMANN, F. & TUTTLE, L. C. J. Biol. Chem., 159: 21, 1945 .
68. LEVY, G. A. & CONCHIE, J. In: NEUFELD, E. F. & GINSBURG,
V. (eds.) Methods in Enzymology, vol. 8, New York, Aca-
demic Press, 1966, p. 571.
69. HOLZER, H. & HOLZER, E. Z. Physiol. Chem., 291:67, 1952.
70. GREEN, R. C. & O'BRIEN, P.J. Biochem. J., 105: 585, 1967.
71. RONCA, G.; BAUER, C. & ROSSI, C. A. Eur. J. Biochem., 1:
434, 1967.
72. BOYER, P. D. & SEGAL, H. L. J. Biol. Chem., 204:265, 1953 .
73. LI, T. K. & VALLEE, B. L. Biochem. Biophys. Res. Commun.,
12: 44, 1963.
74. Van EYS, J.; KRERSZCHMAR, N. S. T. & CUNNINGHAM, L. W. Bio
chem. Biophys. Res. Commun., 8: 243, 1962.
75. SABATO, G. D. & KAPLAN, N. O. Biochemistry, 2: 776, 1963.
76. GRIMM, F. C. & DOHERTY, D. G. Biochim. Biophys. Acta, 57:
381, 1962.
77. SUND, H. In: SINGER, T. P. Biological Oxidations, New
York, Interscience Publishers, 1968, p. 641.
78. CLELAND, W. W. Biochim. Biophys. Acta, 67: 104, 1963.
79. CLELAND, W. W. Biochim. Biophys. Acta, 67: 173, 1963.
80. WALTER C. & FRIEDEN, E. In: NORD, F. F. (ed) Advances in
Enzymology, vol. 25, New York, Interscience Publishers,
1963, p. 167.
81. THEORELL, H. & CHANCE, B. Acta Chem. Scand., 5: 1127, 1951.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e à Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná, pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho; à Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior - CAPES e à Universidade Federal de Santa Catarina, pelo suporte financeiro que possibilitou a elaboração desta tese; e, de modo especial, ao Dr. Luis Alberto da Silva Veiga, pela orientação e estímulo.